

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Mikrobiologie
der Justus Liebig-Universität Giessen

Direktor: Prof. Dr. E. Küster

und dem Institut für Biochemie des Bodens
der Forschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig

Direktor: Prof. Dr. W. Flaig

WACHSTUM UND HUMINSTOFFBILDUNG EINIGER BODENPILZE UNTER DEM EINFLUSS VON TONMINERALEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von

Dipl. - Ing. Zdeněk Filip, C.Sc.
aus Prag / ČSSR

Giessen 1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Mikrobiologie
der Justus Liebig-Universität Giessen

Direktor: Prof. Dr. E. Küster

und dem Institut für Biochemie des Bodens
der Forschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig

Direktor: Prof. Dr. W. Flaig

WACHSTUM UND HUMINSTOFFBILDUNG EINIGER BODENPILZE UNTER DEM EINFLUSS VON TONMINERALEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von

Dipl. - Ing. Zdeněk Filip, C.Sc.

aus Prag / ČSSR

Giessen 1970



Dekan: Prof. Dr. F. Grossmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Küster
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Schönhals

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 1970

Meinem verehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. Ing. V. Káš, Dr.Sc.
gewidmet.

Diese Arbeit wurde im Institut für Biochemie des Bodens der Forschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig-Völkenrode durchgeführt. Ihre Einreichung als Dissertationsarbeit wurde durch ein freundliches Übereinkommen zwischen Herrn Prof. Dr. W. Flaig, Direktor des Instituts für Biochemie des Bodens, und Herrn Prof. Dr. E. Küster, Direktor des Instituts für Landwirtschaftliche Mikrobiologie der Justus Liebig-Universität in Giessen, ermöglicht. Beiden Herren bin ich sehr zu Dank verpflichtet. Für die wertvollen Ratschläge, sowie die mir zuteil gewordene Förderung bin ich Herrn Professor Dr. Flaig besonders dankbar.

Ferner möchte ich Herrn Dr. Haider, Leiter des Arbeitsgebietes "Biochemie der Mikroorganismen" im Institut für Biochemie des Bodens, für die vielen Anregungen und seine stete Hilfsbereitschaft meinen herzlichen Dank aussprechen. Auch danke ich ihm für seine Hilfe bei der Abfassung der Dissertation in deutscher Sprache. Herrn Dr. H. Beutelspacher, Leiter des Arbeitsgebietes "Kolloidchemie" des gleichen Instituts, danke ich für die Messungen der Röntgenbeugungsspektren von Tonmineralen und für wertvolle Diskussionen.

An dieser Stelle sei auch der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Forschungsstipendium und der Landwirtschaftlichen Hochschule in Prag für meine Beurlaubung vielmals gedankt.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1 Mikroorganismen und Bildung von Huminstoffen ..	2
1.2 Charakterisierung der wichtigsten Tonminerale .	7
1.3 Wechselwirkungen von Tonmineralen und Mikroor- ganismen	11
1.31 Sorptionerscheinungen	11
1.32 Physiologische Beeinflussung	14
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Organismen	19
2.2 Tonminerale	20
2.3 Kultivierungsbedingungen	23
2.4 Analytische Methoden	24
3. VERSUCHSERGEBNISSE	28
3.1 Einfluß von Tonmineralen auf die Bildung der Bio- masse bei <u>Epicoccum nigrum</u> und <u>Stachybotrys char-</u> <u>tarum</u>	28
3.2 Einfluß von Tonmineralen auf die Nährstoffbilanz bei <u>E. nigrum</u> und <u>S. chartarum</u> unter verschiede- nen Kultivierungsbedingungen	33
3.3 Einfluß von Tonmineralen auf die Huminstoffbil- dung durch <u>E. nigrum</u> und <u>S. chartarum</u>	41
3.4 Charakterisierung der gebildeten Huminstoffe ..	57
3.41 Chemische Untersuchungen	57
3.42 Spektrophotometrische Untersuchungen	62
3.5 Veränderungen an Montmorillonit während des Pilz- wachstums und der Bildung von Huminstoffen	70
3.6 Sorptionerscheinungen von Huminsäurevorstufen an Montmorillonit	76
3.7 Sauerstoffaufnahme von phenolischen Verbindungen in Anwesenheit von Montmorillonit	78
4. DISKUSSION	80
5. ZUSAMMENFASSUNG	92
LITERATURVERZEICHNIS	95

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

=====

Nach der Theorie von LAZAREW (1949) ist der Boden ein heterogenes System, das aus zwei Grundbestandteilen - einem inerten (dem sogenannten Bodenskelett) und einem aktiven - zusammengesetzt ist. Der aktive Bestandteil wurde auch als bio-organo-mineralischer Komplex bezeichnet. Die einzelnen Bestandteile dieses Komplexes - Bodenmikroflora, organische und anorganische Kolloide, Bodenlösung und Bodengase - beeinflussen sich gegenseitig. Die Tätigkeit der Mikrobenpopulation bewirkt eine Mineralisierung und Humifizierung der organischen Substanz und beeinflusst dadurch die Bodenfruchtbarkeit.

Die organische Substanz des Bodens wird als Humus bezeichnet und stellt ein breites Spektrum von organischen Stoffen dar. So definiert z.B. KÁŠ (1964) Humus als einen Komplex der abgestorbenen organischen Stoffe von pflanzlicher, tierischer und mikrobieller Herkunft, die sich in unterschiedlichem Abbau- und Humifizierungsgrad befinden und in unterschiedlichen Wechselbeziehungen zu den anorganischen Bodenbestandteilen stehen. Unter den Bestandteilen des Humus nehmen die Huminstoffe eine besondere Stellung ein. Über ihre Entstehung, ihren chemischen Aufbau und ihre spezifischen Eigenschaften liegen so zahlreiche Untersuchungen vor, daß es hier unmöglich ist, sie in angemessener Weise zu zitieren. Lediglich wird im Abschnitt 1.1 kurz über die Beteiligung der Mikroorganismen bei der Huminstoffbildung berichtet werden. In anderen Fragen sei auf die Übersichtsarbeiten von WAKSMAN (1936), FLAIG (1955, 1966, 1970), SCHEFFER und ULRICH (1960), KONONOVA (1963, 1966a), HURST und BURGESS (1967) u.a. verwiesen.

Wie bereits erwähnt, findet die Bildung der Huminstoffe im Bereich des bio-organo-mineralischen Komplexes im Boden statt. Von den anorganischen Komponenten gehören die Tonminerale in ihrem kolloidalen Zustand zu aktiven Bestandteilen, welche die Tätigkeit der Mikroorganismen beeinflussen. Von FILIP (1967d, 1968c, 1969a) wurde je nach den verwendeten Kultivierungsbedingungen ein unterschiedlicher Einfluß der Tonminerale auf die Huminstoffbildung durch eine komplexe Bodenmikroflora in Modellversuchen gezeigt. Mehrere im Abschnitt 1.1 erwähnte Untersuchungen zeigten, daß einzelne Mikroorganismen zur Bildung von huminsäurenähnlichen Polymerisaten fähig sind. Es schien daher wichtig, mit Reinkulturen solcher Organismen zu arbeiten und auf diese Weise den Einfluß der Tonminerale auf Wachstum und Huminstoffbildung zu erkennen. Damit soll gleichzeitig ein Beitrag zu der Frage der Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Tonmineralen geliefert werden.

1.1 Mikroorganismen und Bildung von Huminstoffen

=====

Unter Humusbildung versteht man nach VÁLEK et al. (1962) einen Prozess, bei dem aus primären, den spezifischen Huminstoffen nicht ähnlichen, organischen Substanzen, die Huminstoffe gebildet werden.

KAŠ (1964, 1966) beschreibt zwei Phasen der Humifikation. In der ersten werden organische Substanzen durch verschiedene Mikroorganismen in einfachere Stoffe abgebaut, gegebenenfalls auch mineralisiert; in der zweiten Phase läuft, ausgehend von diesen einfacheren organischen Stoffen, die Bildung der komplizierter gebauten Huminstoffe ab. Dabei spielen wiederum verschiedene Mikroorganismen und Produkte ihrer Lebenstätigkeit - besonders einfache stickstoffhaltige Stoffe, wie Aminosäure, Ammoniak, ferner Polysaccharide, Polyuronide und phenolische Stoffe - eine besondere Rolle. Auf diese Weise verläuft z.B. auch die Humifizierung von pflanzlichem Lignin, wie es von FLAIG (1958, 1962), FLAIG

et al. (1959), FLAIG und HAIDER (1968) sowie MANSKAJA und KODINA (1968) beschrieben wird.

Nach KONONOVA (1963) tritt bei der Humifizierung von Pflanzenresten eine Folge von Mikroorganismen auf: Schimmelpilze und nichtsporenbildende Bakterien → sporenbildende Bakterien → cellulosezersetzende Myxobakterien → Aktinomyzeten.

Nach einer Theorie von NOVÁK (1963) wird die Humifizierung des in den Boden gelangenden organischen Materials durch eine komplexe Bodenmikroflora bewirkt, denn nur eine solche Mikrobenpopulation verfügt über den notwendigen vielseitigen enzymatischen Apparat. Zur Durchführung der Humifizierung, die einen vorwiegend biologisch-synthetischen Vorgang darstellt, ist eine gewisse Menge freier Energie notwendig. Diese Energie ist hauptsächlich von der Zusammensetzung des Substrates abhängig. Die produktive Humifizierung steht in einer bestimmten Beziehung zu den anaeroben und aeroben Vorgängen. Durch anaerobe Vorgänge werden vorwiegend niedermolekulare organische Stoffe gebildet, die in den weiteren Phasen zu Huminstoffen umgewandelt werden. Bei den aeroben Vorgängen wird vor allem Energie frei, vermittels derer die Synthese durchgeführt wird.

Nach FLAIG (1958) hängt die Geschwindigkeit der Humifizierung von der Anzahl der daran beteiligten Mikroorganismen ab. Sie wird weiterhin auch durch die Menge der anwesenden anorganischen Nährstoffe bestimmt, die die Mikroorganismen für ihren Stoffwechsel benötigen. Hierbei stellen im allgemeinen die für das Mikroorganismenwachstum zur Verfügung stehenden Stickstoffverbindungen einen begrenzenden Faktor dar, da diese im Verlauf der Humifizierung in die entstehenden Verbindungen eingebaut werden können und damit der unmittelbaren mikrobiellen Verwertung entzogen sind.

Die in der Einleitung zitierten Übersichtsarbeiten stimmen darin überein, daß Huminstoffe Polymere darstellen, die durch eine Verknüpfung phenolischer Einheiten mit stickstoffhaltigen Verbindungen unter der Beteiligung von Kohlenhydraten entstehen. Diese phenolischen Verbindungen können nach Ergebnissen von MORRISON (1963), FARMER und MORRISON (1964) wie auch BURGESS et al. (1964) und FLAIG (1966) ihren Ursprung in den phenolischen Bestandteilen der Pflanzenreste haben. Es gibt jedoch mehrere Beweise für die Bildung von Huminstoffen durch Mikroorganismen aus synthetischen Substraten. Bei der Autolyse von Mikroorganismenkulturen entstehen in vielen Fällen dunkelgefärbte Stoffe, die ein ähnliches Verhalten wie Huminsäuren zeigen (KÜSTER, 1952). Ein Teil dieser stickstoffhaltigen Stoffe wird aus gefärbten Stoffwechselprodukten gebildet (v. PLOTHO, 1951; LAATSCH et al. 1951) und kommt z.B. oft bei verschiedenen Streptomycesarten vor (KÜSTER, 1955; KUTZNER, 1968). KÜSTER (1953) konnte dabei nachweisen, daß die Braunfärbung der Kulturlösungen in manchen Fällen von der Aktivität der Phenoloxidasen abhängig ist. Da Phenoloxidasen ausschließlich in der Lage sind, aromatische Verbindungen zu oxydieren, muß auch in den Fällen, in denen keine aromatischen Verbindungen von Anfang an als Kohlenstoffquelle den Kulturlösungen zugesetzt worden waren, die Entstehung der dunkelgefärbten Stoffe über aromatische Zwischenstufen verlaufen. KONONOVA und ALEXANDROVA (1949, 1958), wie auch ALEXANDROVA (1962) haben hierzu durch Versuche mit Aktinomyzeten und Pilzen gezeigt, daß selbst in jenen Fällen, in denen Zucker die einzige Quelle organischer Substanz war, mit zunehmendem Alter der Kulturen die Bildung gefärbter "Humus-Substanzen" beobachtet wurde. Ähnliche Beobachtungen machten MARTIN et al. (1967) bei *E. nigrum*. Dieser und andere mikroskopische Bodenpilze bilden in einer Glukose-Asparagin-Nährlösung Phenole, die sich über den Acetat-Malonat- oder Shikimisäure-Weg bilden (MARTIN und HAIDER, 1969; HAIDER und MARTIN, 1967, 1970). Der erste Weg führt zu Orsellinsäure und verwandten Verbindungen, der andere zu p-Hydroxymzimtsäure. Durch die Einführung von

Methylgruppen und Hydroxylgruppen sowie durch einen partiellen Abbau von Seitenketten und die Oxydation von Methyl- zu Carboxylgruppen entsteht dabei eine größere Anzahl von Phenolen. Ein Teil dieser Phenole kann durch Luft-sauerstoff in neutralem oder schwach alkalischem Bereich oxydiert werden und mit den anderen Phenolen sowie niedermolekularen Stickstoffverbindungen zu huminsäurenähnlichen Stoffen polymerisieren. Unter diesen autoxydablen Verbindungen treten dabei 2,3,5-, 2,4,5- und 3,4,5-Trihydroxytoluol, weiterhin Gallussäure und 2,3,4-Trihydroxybenzoesäure besonders hervor. Die Art der Phenole und der Verlauf der Oxydation sind bei verschiedenen Pilzarten unterschiedlich. Meistens verläuft jedoch die Oxydation der Phenole zu den Huminsäuren über einen Autoxydationsmechanismus ohne Beteiligung von Phenoloxidasen. Lediglich konnte eine Beteiligung von Peroxydasen bei der Einführung der Hydroxylgruppen wahrscheinlich gemacht werden. Die Bildung der Huminsäuren läuft erst bei beginnender Autolyse ab, wenn durch die Ausscheidung von Ammoniak das Kultivationsmedium neutral oder schwach alkalisch ist. Die Huminsäuren liessen sich sowohl aus der Lösung als auch aus dem Mycel isolieren. In Gegenwart von lignifiziertem Pflanzenmaterial waren die Erträge der Huminsäuren wesentlich erhöht. Es konnte ein partieller Abbau des Lignins nachgewiesen werden (MARTIN und HAIDER, 1969; HAIDER und DOMSCH, 1969) und in die Huminsäuren waren neben den Pilzphenolen auch solche des Lignins einpolymerisiert.

Nach der Meinung von KONONOVA (1963, 1966b) verläuft die Oxydation der Polyphenole unter Bodenbedingungen überwiegend durch Polyphenoloxidasen. Diese werden von vielen Mikroorganismengruppen gebildet und ausgeschieden. Die Bedeutung der Phenoloxidasen als Biokatalysator für den Boden ist besonders groß, da die Autoxydation der Polyphenole bei niedrigen Temperaturen und schwach saurer Reaktion nur sehr langsam erfolgt.

erwähnten Pilzen gut untersucht sind, waren sie ein geeignetes Objekt, um den Einfluß verschiedener Tonminerale auf die Huminstoffbildung zu überprüfen.

1.2 Charakterisierung der wichtigsten Tonminerale

=====

Die Tonminerale gehören zu den sekundären hydratisierten Aluminiumsilikaten. In Böden sind diese vorwiegend als Minerale der Kaolin-, Montmorin- und der glimmerähnlichen Gruppe (Illite) vorhanden. Das Übergewicht der einen oder anderen Minerale ist vom Prozeß der Bodenbildung abhängig. In der gemäßigten Zone von Mitteleuropa findet man z.B. meistens die Vertreter der Illit- und Montmoriningruppe, öfter aber auch verschiedene Mischstrukturen. Die Kaolinite sind nur als Beimischung vertreten.

Die Tonminerale sind charakteristisch über die Verbindung einer Oktaeder- mit einer Tetraederschicht (Zweischichtminerale) oder über die Verbindung der Oktaeder- mit je einer Tetraederschicht von unten und oben (Dreischichtminerale) ausgebaut. Eine solche zusammengehörige Schichtfolge wird als Schichtpaket oder Elementarschicht bezeichnet. Die einzelnen Schichtpakete der Tonminerale sind durch Zwischenräume getrennt, deren Abstände sich besonders bei den Dreischichtmineralen entweder vergrößern oder verkleinern können, wobei dann von Expansion bzw. Kontraktion gesprochen wird. Bei der Einlagerung von Wasser in die Zwischenräume der Schichtpakete spricht man von Quellung. Weiterhin ist dadurch vor allem die Sorptionsfähigkeit beeinflusst. Sie hängt nicht nur von der äußeren Oberfläche, sondern auch von der inneren Schichtordnung ab.

Als Hauptvertreter der Zweischichtminerale tritt der Kaolinit auf (Abb. 2).

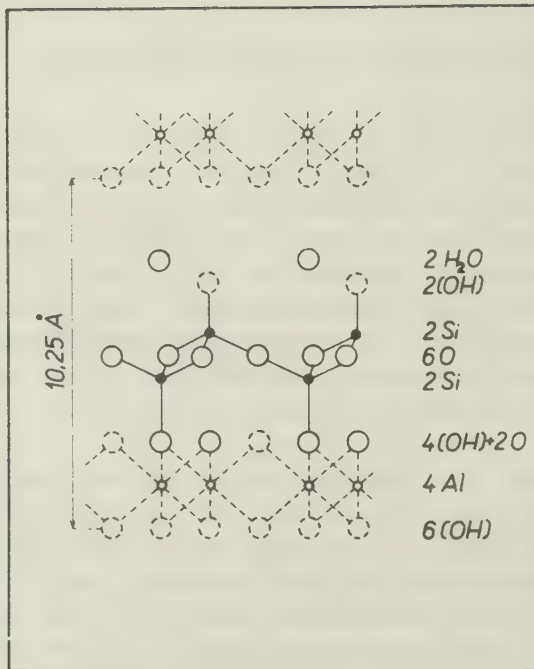


Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur von Kaolinit
(nach BEDRNA et al. 1968)

Nach der Beschreibung von BEUTELSPACHER und VAN DER MAREL (1968) wechselt sich bei diesem Mineral eine Si(Al,Fe)-O-Tetraederschicht mit einer Al(Mg,Fe)-OH-Oktaederschicht ab. Da sich die Schichten in regelmäßiger Folge abwechseln, werden solche Zweischichttonminerale auch als 1:1 - Minerale bezeichnet. Die Sorptionskapazität des Kaolinites ist relativ niedrig, sie schwankt zwischen 3-20 meq/100 g (STEJSKAL, 1967). Er besitzt kein expandierendes Gitter und seine Quellungsfähigkeit ist gering. In Böden kann man Kaolinit innerhalb des Korngrößebereiches 0,1-20 μ antreffen (STOCH und SIKORA, 1968).

Die glimmerähnlichen Tonminerale, darunter die Illite, sind fast in allen Böden stark verbreitet. Die Elementarschichten bauen sich nach BEUTELSPACHER und VAN DER MAREL (1968) aus einer $\text{Al}(\text{Mg},\text{Fe})\text{-OH}$ -Oktaederschicht auf, die jeweils von oben nach unten mit einer $(\text{Si},\text{Al})\text{-O}$ -Tetraederschicht hauptvalenzmäßig verbunden ist. Die Schichtenfolge ist regelmäßig, so daß man diese Tone als 2:1 - Minerale bezeichnet. Illit ist von dieser Gruppe der Hauptvertreter und verfügt über ein teilweise aufweitbares Gitter. Seine Austauschkapazität schwankt zwischen 20-34 meq/100 g (STEJ-SKAL, 1967). Er gehört zu den häufigsten Mineralen der mitteleuropäischen Böden und tritt in der Korngröße 0,1-1 μ auf (STOCH und SIKORA, 1968).

Als potentiell stärkster mineralischer Sorbent kommt in den Böden der gemäßigten Zone Montmorillonit vor (Abb. 3).

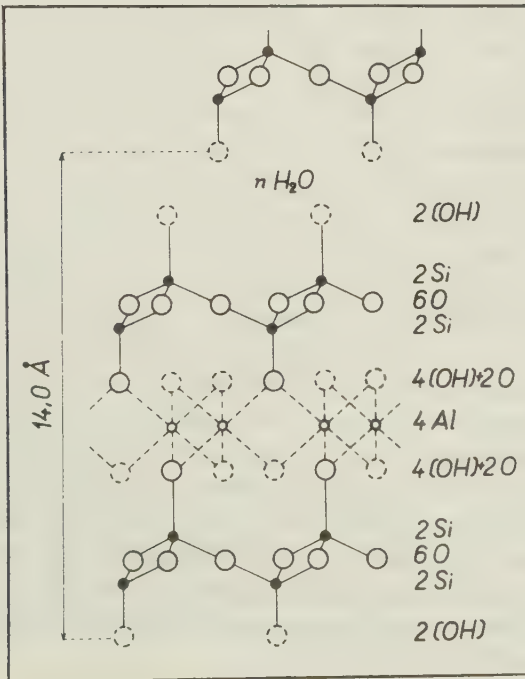


Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur von Montmorillonit (nach BEDRNA et al. 1968).

STREMME (1954) bezeichnet ihn als charakteristisches Tonmineral in der Schwarzerde, HUTCHENSON et al. (1959) beschrieben, daß in der Tonfraktion des Bodenprofils von Parabraunerde vorwiegend Montmorillonit auftritt. BEUTELSPACHER et al. (1966) haben dieses Tonmineral hauptsächlich in tieferen Horizonten des Bodenprofils gefunden. Nach STOCH und SIKORA (1968) kommt Montmorillonit im Boden in Korngröße unter $0,2 \mu$ vor. Seine Sorptionskapazität beträgt zwischen 80-150 meq/100 g (STEJSKAL, 1967) und seine Gesamtoberfläche liegt zwischen 400-800 m^2/g . Dieser Hauptvertreter der Gruppe von Montmorinmineralen baut sich, ähnlich wie Illit, nach den Angaben von BEUTELSPACHER und VAN DER MAREL (1968) aus Elementarschichten auf, bei denen eine Al (Mg, Fe)-OH-Oktaederschicht oben und unten mit je einer (Si, Al)-O-Tetraederschicht hauptvalenzmäßig verbunden ist. Auch Montmorillonit gehört danach zu den 2:1- oder Dreischichtmineralen. Si-Tetraeder-Doppelschichten sind durch schwach gebundenes Wasser getrennt, von dessen Menge sowie von gebundenen Kationen hängt die Entfernung zwischen den einzelnen Dreierschichten ab. Sie beträgt im Durchschnitt 8,6 Å (STEJSKAL, 1967). Gegenüber den Illiten zeigen die Montmorinminerale (Montmorillonoiden) eine höhere Quellfähigkeit. Dabei können die Zwischenräume ihren Durchmesser mehrmals vergrößern, je nach Art und Zahl der gebundenen Moleküle. Man nimmt an, daß ungefähr 80 % der austauschbaren Kationen in den Zwischenschichträumen und 20 % an der Peripherie des Gitters gebunden sind. Als eine Ursache der Adsorption von austauschbaren Kationen in den Zwischenschichträumen wird von TSCHUCHROV (1955) die Anwesenheit der negativen Ladungen angenommen, die durch eine Substitution des Siliciums in Si-Tetraedern durch Aluminium oder des Aluminiums in Al-O-OH-Oktaedern durch 2-wertige Kationen, z.B. von Mg, bedingt ist. Die Ursache der Bindung von austauschbaren Kationen an den Gitterrändern sieht dieser Autor in den freien Elektronenpaaren der Sauerstoffionen. Anstelle der austauschbaren anorganischen Kationen können auch organische Basen treten.

1.3 Wechselwirkungen von Tonmineralen und Mikroorganismen

=====

1.31 Sorptionerscheinungen

Man kann annehmen, daß es im Boden zu zweierlei Wechselwirkungen zwischen Tonmineralen und Mikroorganismen kommt:

1) direkte Zwischenwirkung

- eine beidseitige Sorption der Tonmineralkolloidteilchen und der Mikrobenzellen.

2) indirekte Zwischenwirkung

- Sorption der organischen und mineralischen Nährstoffe
- Sorption extracellulärer Enzyme und anderer Stoffwechsel- oder Autolyseprodukte.

Eine besondere Aufmerksamkeit wurde seit Jahren den Fragen der direkten Sorption zwischen Tonmineralen bzw. anderen Sorbenten und Mikroorganismen gewidmet. Man spricht dabei öfter von einer "Adsorption" bzw. "Adhäsion" (nach der Terminologie von ESTERMANN und McLAREN, 1959). Diese Erscheinung wird durch die Art der Tonminerale (unterschiedliche Sorptionskraft), deren Konzentration, die Größe der Tonteilchen und weiterhin durch die Art der Mikroorganismen beeinflusst. So stellte CHUDJAKOV (1926) fest, daß die beweglichen Bakterien schwächer als die unbeweglichen adsorbiert werden. Zum Beispiel wurden die unbeweglichen Bacillus mycoides-Zellen durch Boden aus einer Flüssigkeitssuspension zu 93,5 % sorbiert, während dies bei den beweglichen Zellen von Escherichia coli nur zu 11,5 % der Fall war. Die maximale Adsorption wurde durch Teilchen mit einem Durchmesser von 0,003 mm bis 0,03 mm erreicht. Ähnlich kamen GUNNISON und MARSHALL (1937) bei einem Vergleich der Adsorption von E. coli, Clostridium welchii und Lactobacillus acidophilus durch Aktivkohle, Kaolin, CaCO_3 und Sesquioxiden zu der Ansicht, daß der Typ der Adsorbenten weniger wichtig ist als die Art der Organismen. Dementsprechend beschrieben ZVJAGINCEV

und VELIKANOV (1968) eine fast hundertprozentige Adsorption von Pseudomonas pyocyanea durch Montmorillonit und nur eine etwas niedrigere Adsorption durch Kaolinit und Nontronit, während Bacillus mesentericus nur zu 40 bis 50 % durch diese Mineralien adsorbiert wurde. Nach MIYAMOTO (1959) werden auch Viren durch Ton- oder andere Bodenteilchen adsorbiert. Die Adsorption der Mikroorganismen wird von der Art der austauschbaren Kationen der Sorbenten stark beeinflusst. PEELE (1936) adsorbierte Azotobacter an Bodenteilchen. Bei einer Elution der mit Na^+ , Li^+ , NH_4^+ und K^+ gesättigten Böden kam es zu einer stärkeren Desorption der Zellen, während diese bei den mit Al^{+++} , Fe^{+++} und Mg^{++} gesättigten Böden schwächer war. KÁS (1966) beobachtete elektronenmikroskopisch die Adsorption von E. coli aus einer Flüssigkeitskultur an der Oberfläche von Tonmineralen. Um die Na-Bentonit-Teilchen, die meist gut suspendiert in der Lösung bleiben, bildeten sich kleinere Anhäufungen der Bakterien. Ca-Bentonit und Kaolinit bildeten Aggregate, in denen Tonmineralteilchen und Bakterien adsorbiert waren.

Wie TSCHAPEK und GARBOSKY (1950) zeigten, ist die Sorptionskapazität der Minerale für die Mikroben begrenzt. So adsorbierten 2 g Quarz etwa 4×10^7 Bakterienzellen. Die Adsorption konnte nicht mehr weiter gesteigert werden. ZVJAGINCEV (1962) stellt jedoch fest, daß ein mit einer Bakterienart gesättigter Ionenaustauscher immer noch in der Lage ist, Bakterienzellen anderer Arten zu adsorbieren.

Die Gleichgewichtseinstellung zwischen dem Adsorptionsträger und den adsorbierten Mikroorganismen erfolgt rasch. So fanden GUNNISON und MARSHALL (1937) keinen Unterschied in der Adsorption der Bakterien durch Kaolinit nach 15 Minuten oder 3 Stunden. TSCHAPEK und GARBOSKY (1950) beschrieben eine starke Erhöhung der Adsorption innerhalb der ersten 10 Minuten und nur eine schwache weitere Erhöhung innerhalb einer Stunde. Die Adsorption von P. pyocyanea erreichte in den von VELIKANOV und ZVJAGINCEV (1968) durchgeführten Versuchen ihr Maximum bereits nach 20 Minuten.

Der pH-Wert ist für die Adsorption der Mikroorganismen von Bedeutung. NOVOGRUDSKY (1936) fand im Boden bei pH 5,8 ein Minimum der Adsorption von E. coli, hingegen für B. mycoides bei pH 6,7. PEELE (1936) arbeitete im pH-Bereich von 6,3 bis 7,6 und stellte bei Azotobacter und B. mycoides eine langsame Abnahme der Adsorption von pH 6,3 bis 7,3 fest, während zwischen pH 7,3 bis 7,6 die Adsorption stark abnahm. GUNNISON und MARSHALL (1937) beschrieben, daß der Adsorptionsgrad von fünf verschiedenen Mikroorganismen bei pH 5,6 höher war als bei pH 7,2. TSCHAPEK und GARBOSKY (1950) berichten über eine scharfe Differenzierung der Adsorption von Azotobacter durch Quarz. Das Maximum liegt nach den Autoren bei pH 4,5 und sinkt ständig bis zum pH 5,5 ab. Dann ist die Adsorption nur noch schwach und verschwindet gegen pH 7,2. VELIKANOV und ZVJAGINCEV (1968) stellten eine fast hundertprozentige Adsorption von P. pyocyanea durch Bentonit bei pH 5,0 fest, bei pH 6,9 eine etwa 80 prozentige und bei pH 8,0 nur noch eine etwa 60 prozentige.

Es kommt weiterhin auch zur Adsorption von kolloidalen Ton-
teilchen an die Zellwand der Mikroorganismen. LAHAV (1962)
untersuchte die Adsorption von Ca- und Na-Bentonit an B. subtilis. Nach seinen Ergebnissen wird die Geschwindigkeit der
elektrophoretischen Beweglichkeit der Zellen mit adsorbier-
tem Na-Bentonit erhöht, bei der Adsorption mit Ca-Bentonit
dagegen erniedrigt. Mit dem elektronoptischen Studium der Ad-
sorption von kolloidalen Teilchen des Na- und Ca-Bentonits
und Na- und Ca-Kaoliniten beschäftigte sich KÁŠ (1966). Eine
interessante Feststellung machte MARSHALL (1964,1968), der
zu einem mit Rhizobium trifolii beimpften Grausandboden Kao-
linit, Illit und Montmorillonit in Mengen von 5 Gewichtspro-
zent beimischte. Das Gemisch wurde bei 30°C ausgetrocknet
und einer Temperatur von 50°C bzw. 70°C ausgesetzt. Montmo-
rillonit und Illit zeigten dabei eine Schutzwirkung und un-
terstützten stark das Überleben der Rhizobien gegenüber dem
nicht mit Tonmineralen versetzten Boden. Zugleich bewies

der Autor eine Adsorption von Montmorillonit auf die Oberfläche von R. trifolii-Zellen. Demnach soll um die Bakterienzellen eine Schutzschicht gebildet werden, in der Wassermoleküle festgehalten sind und dadurch die elektrische Ladung und das Sorptionsverhältnis zugunsten der Bakterien verändert ist. Ähnlich haben MÜLLER und SCHMIDT (1966) festgestellt, daß Azotobacter durch Montmorillonit gegen die schädigende Wirkung der Röntgenstrahlung geschützt wird.

Außer der geschilderten gegenseitigen Sorption von Tonen und Mikroorganismen ist auch die Sorption von Nährstoffen oder Substanzen des mikrobiellen Stoffwechsels von Bedeutung. Dabei handelt es sich vor allem um die Sorption von Proteinen (ENSMINGER und GIESEKING, 1939, 1941, 1942; PINCK et al. 1954; McLAREN et al. 1954, 1958; AMBROŽ, 1964, 1965, u.a.), Enzymen (KROLL und KRAMER, 1955; ESTERMAN und McLAREN, 1959; McLAREN, 1960; MORTLAND und GIESEKING, 1952; SKUJINS, 1967, u.a.), Aminosäuren (TURNER, 1955; PUTNAM und SCHMIDT, 1959; KOTER und CHODAN, 1964, u.a.), Nukleinsäuren und Nukleotiden (GORING und BARTHOLOMEW, 1952; FLAIG et al. 1955, u.a.), Mono- und Polysacchariden (LYNCH et al. 1956, 1957; GREENLAND, 1956, u.a.) sowie Antibiotika (PINCK et al. 1961).

1.32 Physiologische Beeinflussung

Im Mittelpunkt des Interesses stehen die durch mineralische Kolloide verursachten Veränderungen des mikrobiellen Stoffwechsels. So beobachteten CONN und CONN (1941) einen Einfluß der Tonminerale auf die Gesamtzahl von Bakterien. Bei Zusatz von 5 % Bentonit zu einer Mischpopulation in Sandkulturen stellten die Autoren eine 3- bis 6-fache Erhöhung der Keimzahlen gegenüber der Kontrolle fest. NAUMOVA und GROMYKO (1953) verwandten Gumbrin (Montmorillonit nach GORBUNOV) in Gefäß- und Feldversuchen. Die Gesamtzahl der Mikroorganismen war nicht beeinflusst, jedoch stieg die Zahl der Azotobacter-Zellen, der Aktinomyceten und der

mikroskopischen Pilze an. AMBROŽ (1964, 1965) mischte Sandkulturen 1-15 % Bentonit bei. Sowohl bei der Kultivation in saurem (pH 4) oder basischem (pH 8) Milieu stellte der Autor eine Abnahme der Mikrobenzahl fest. Dieser "Inhibitionseffekt" könnte jedoch besonders bei niedrigem pH-Wert durch stärkere Adsorption der Mikrobenzellen an die Tonteilchen verursacht sein, was bei der angewandten Plattenzählmethode zu beträchtlichen Ungenauigkeiten führen kann. Den Einfluß wesentlich geringerer Zugaben von 0,12 %, 0,25 % und 0,5 % Bentonit prüfte FILIP (1967a, b, c, d, 1968a, c) in Modellversuchen bei belüfteten Flüssigkeits-, Sand- und Bodenkulturen. Er fand selbst mit Hilfe der Plattenmethode beträchtlich erhöhte Keimzahlen von Bakterien. Beachtenswert war nicht nur die Erhöhung selbst, sondern auch eine Beschleunigung der Zunahme der Mikrobenzahlen. Bei Bodenkulturen wurde außer Mikrobenvermehrung auch eine verstärkte Aggregation beobachtet. ZVJAGINCEV und VELIKANOV (1968) haben eine wesentliche Erhöhung der Keimzahl von P. pyocyanea und B. mesentericus durch Zugabe von Kaolinit, insbesondere jedoch von Montmorillonit zu den geschüttelten Flüssigkeitskulturen gefunden. KUBISTA (1969) bestätigt einen günstigen Einfluß des Bentonits (1 %) in den belüfteten und besonders in den nicht belüfteten mit Mischflora von Bodenmikroorganismen angesetzten Sandkulturen auf eine Wachstumsbeschleunigung von Bakterien, Aktinomyceten und Pilzen.

NOVÁKOVÁ (1966) kommt aufgrund der Untersuchung von Wachstumskurven bei E. coli zu der Ansicht, daß die Wirkung des Tons mehr in einer Verschiebung der Wachstumsdynamik als im Gesamtzuwachs der Mikroben liegt. Durch Bentonit und seine Na- und Ca-Form kommt es zur Verkürzung der Lag-Phase, während Kaolinit eine Verlängerung bewirkt. Ähnlich beobachteten dies HATTORI und FURUSAKA (1961) bei Azotobacter agile, sowie STOTZKY und REM (1966) bei mehreren Bakterienarten.

Im Sinne der ökologischen Einwirkung der Bodenteilchen sind wenigstens einige Arbeiten zu erwähnen. Zum Beispiel fanden BHAUMIK und CLARK (1947) eine maximale Anzahl an Bakterien in Böden mit einem hohen Anteil an Tonteilchen. CHAO JUJ-SJAN und TSCHEN-CZJUAN (1964) stellten eine steigende Menge von B. subtilis- und B. mesentericus-Zellen im Zusammenhang mit der Erhöhung der Feinfraktion des Bodens fest. Interessante ökologische Beobachtungen publizierte STOTZKY et al. (1961). Der Autor beobachtete einen Zusammenhang zwischen der Verbreitung des pathogenen Pilzes Fusarium oxysporum f. cubense und dem Vorkommen eines mit K^+ gesättigten Dreischichtminerals in Böden der Bananenplantagen in Mittel-Amerika. Je stärker dieses Tonmineral in Böden vertreten war, desto schwächer war die Verbreitung des Pilzes. Es wurde keine andere Korrelation gefunden. Dem Autor zufolge wurde der pH-Wert durch Ton beeinflusst, was sich im Vorkommen der anderen Mikroorganismen (einschl. antagonistischen Mikroben) widerspiegelt.

Angaben in der Literatur über den Einfluß verschiedener Sorbenten auf die physiologische Tätigkeit der Mikroorganismen lauten nicht nur unterschiedlich, sondern auch manchmal widersprechend. Dies ist vor allem den unterschiedlichen Material-, Kultivierungs- und Methodenbedingungen zuzuschreiben. So fand CHUDJAKOV (1926) nach Zugabe von mineralischen Bodenteilchen zu den Kulturen von B. mycoides, B. prodigiosum, B. megatherium und B. coli commune (E. coli) eine starke Hemmung der CO_2 -Produktion. Die gleiche Feststellung machte PEELE (1936) bei A. chroococcum. Vier ausführliche Studien über die Beeinflussung der Mikrobenrespiration durch mineralische Adsorbenten haben STOTZKY (1966a, b) sowie STOTZKY und REM (1966, 1967) veröffentlicht. So fanden diese Autoren, daß Montmorillonit im Gegensatz zu Kaolinit die Atmung einer Vielzahl von Bakterien erhöht. Die Bakterien unterschieden sich durch ihre Morphologie, Beweglichkeit und Gram-Färbung. Montmorillonit zeigte eine günstige Wirkung

besonders durch eine Verkürzung der Lag-Phase. Versuche mit 27 Pilzarten ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Bei Zugabe von weniger als 4 % Montmorillonit oder Kaolinit wurde die Respiration der Mycelhomogenisate nicht beeinflusst. Eine höhere Zugabe von Montmorillonit hatte jedoch eine deutliche Erniedrigung der Respirationswerte zur Folge.

NOVÁKOVÁ (1966, 1967, 1968, 1969) untersuchte mit Hilfe der Respirationswerte die Ausnutzbarkeit von Glukose und Pepton durch eine Bodenmischflora in Flüssigkeits- und Sandkulturen. Bentonit und seine Ca- und Na-Form beschleunigten in Konzentrationen von 0,1 % bis 3 % die Mineralisierung der Glukose in der Lösung. Alle Kaolinit-Formen zeigten eine umgekehrte Wirkung.

FILIP (1968b) ermittelte durch interferometrische Messungen des abgegebenen CO_2 eine Beschleunigung im Abbau des den Flüssigkeitskulturen zugegebenen Kaseins durch Bentonit. In Sandkulturen war die CO_2 -Produktion in den mit Bentonit versetzten Varianten schwächer als in der Kontrolle. Bodenkulturen zeigen in diesem Sinne keine deutlichen Unterschiede.

Mehrere Autoren befassen sich in ihren Arbeiten mit der mikrobiellen oder enzymatischen Ausnutzbarkeit der durch verschiedene Tonminerale sorbierten Substrate. So zeigen ENSMINGER und GIESEKING (1942), daß in interlamellaren Räumen sorbiertes Eiweiß (Albumin und Haemoglobin) gegenüber mikrobieller oder rein enzymatischer Hydrolyse geschützt wird. Kaolinit war in dieser Beziehung unwirksam. ALLISON et al. (1949) berichtet, daß eine Beimischung von Montmorillonit zu Sandkulturen eine Verminderung der Kohlenstoffverluste (vom zugegebenen Substrat) zur Folge hat. Ähnliches fand später FILIP (1967a), der die Mineralisation des Kaseins in Anwesenheit von Bentonit durch C- und N-Verlust beurteilte.

Studien über den Abbau von Gelatine-Bentonit-Komplexen, bzw. Mischungen wurden von PINCK und ALLISON (1951) und PINCK et al. (1954) veröffentlicht. Die auf verschiedene Art vorbereitete und vacuumgetrocknete Gelatine- und Eialbumin-Komplexe zeigten eine Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteolyse, welche vom Eiweiß-Ton-Verhältnis abhängig war.

BIRCH und FRIEND (1956) stellten eine Schutzwirkung des Bentonits beim Gelatine-Abbau fest, während Kaolinit in diesem Sinne unwirksam war. Den Ergebnissen McLAREN's und ESTERMANNs (1956) nach ist durch Kaolinit adsorbiertes Eiweiß wie nicht adsorbiertes auf gleiche Weise von Chymotrypsin abbaubar. ESTERMANNet al. (1959) zeigten auch, daß durch Bentonit adsorbiertes Eiweiß durch Chymotrypsin oder durch eine bakterielle Protease von B. subtilis sowie durch Bodenrein- oder Mischkulturen rasch abgebaut wird.

Nach AMBROŽ (1966a) ist die Proteolyse vom Gehalt an Bentonit abhängig. Bei niedrigerem Bentonitgehalt im Komplex wird die Proteolyse stimuliert. Durch Bentonit sorbierte Proteasen sind teilweise inaktiviert, aber im sorbierten Zustand bleibt ihre Aktivität länger erhalten. Produkte der Proteolyse werden durch Bentonit selektiv sorbiert; die höchste Sorption tritt bei basischen Aminosäuren ein. Weiterhin kann nach AMBROŽ (1966b) die sorbierte Protease durch Ammoniak, Ammoniumsalze, CH_3COONa und NaOH wieder freigesetzt werden. Die Bildung von Proteasen durch eine Mischflora von Bodenmikroorganismen in Flüssigkeits- oder Sandkulturen wird durch Zugabe von 0,1 % bis 5 % Bentonit (insbesondere bei einer Tonkonzentration von 0,1 % bis 2 %) erhöht (AMBROŽ, 1969).

Eine Reihe von Arbeiten ist der Verwertbarkeit der adsorbierten Aminosäuren gewidmet. Nach GREENWOOD und LESS (1960) sind die adsorbierten Aminosäuren für die Mikroorganismen nur wenig verwertbar und auf solche Weise dem biologischen Kreislauf fast ganz entzogen. Demgegenüber sind nach

ZVJAGINCEV und VELIKANOV (1968) die adsorbierten Aminosäuren für P. pyocyanea und B. mesentericus voll ausnutzbar. Nach LYNCH und COTNOIR (1956, 1957) und KUBISTA (1969) sind lösliche wie auch unlösliche Kohlenhydrate, pflanzliche Reste und eiweißhaltige Materialien gegen den enzymatischen und mikrobiellen Abbau in Anwesenheit von Tonmineralen in manchen Fällen geschützt.

ZIEMIECKA et al. (1963) beobachteten bei Zusatz von Bentonit zu Sandboden eine Erniedrigung des N-Verlustes und einen erhöhten Humusgehalt während der Umwandlungen von Gründüngern. Versuche von FILIP (1967a, d, 1968c, 1969a) befaßten sich mit dem Einfluß des Bentonits auf die Bildung von Huminstoffen durch eine Mischflora des Bodens. In Flüssigkeitskulturen hatten die mit Bentonit versetzten Varianten einen niedrigeren Huminstoffgehalt als die Kontrollen. Hingegen war in Sandkulturen die Huminstoffmenge bei Bentonitzusatz deutlich erhöht. In Bodenkulturen wurde eine Erhöhung nur in der Fraktion der mit den mineralischen Bestandteilen eng verbundenen Huminsäuren nach Bentonitzugabe gefunden.

Trotz der teilweisen Widersprüchlichkeit der hier zusammengestellten Literatur zeigt sich, daß Tonminerale einen wichtigen Faktor für die Lebenstätigkeit der Mikroorganismen im Boden darstellen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Organismen

Aufgrund vorhergehender Arbeiten von MARTIN et al. (1967, 1969) sowie HAIDER und MARTIN (1967, 1970), die sich mit dem Vorkommen von huminstoffbildenden, mikroskopischen Bodenzapilzen und dem Mechanismus ihrer Huminstoffbildung befassen, wurden für unsere Versuche zwei huminstoffbildende Pilze ausgewählt - Epicoccum nigrum und Stachybotrys chartarum.

Der mikroskopische Bodenzpilz E. nigrum (Syn. E. purpurascens) gehört nach DOMSCH und GAMS (1970) zur Klasse der Basidiomycetes, Unterklasse Deuteromycetes, Reihe Moniliales (Hyphomycetes), Gattungen mit Aleuriosporen (Chlamydosporen). Es handelt sich um einen Pilz, der weltweit verbreitet ist und bereits aus Böden der verschiedensten Art (Moor, Acker, Wald) isoliert wurde. Sehr häufig ist er auch auf absterbenden Pflanzensubstraten zu finden. Er bildet auffallende Pigmente, die als β -Carotin, γ -Carotin, Torularhodin und Rhodoxantin identifiziert wurden. Die Autoren MARTIN und HAIDER haben in Kulturmedien und teilweise auch im Mycel von E. nigrum huminstoffähnliche Substanzen gefunden. In den vorliegenden Versuchen wurde ein von J.P. MARTIN (University of California, Riverside) aus Boden der californischen Citrus-Plantagen isolierter E. nigrum-Stamm verwendet.

Der zweite in die Versuche einbezogene mikroskopische Bodenzpilz S. chartarum (Syn. S. atra, S. alternans) gehört nach DOMSCH und GAMS (1970) nach seiner taxonomischen Einordnung zur gleichen Klasse, Unterklasse und Reihe wie E. nigrum, jedoch zu den Gattungen mit Phialosporen. Auch dieser Pilz ist weltweit verbreitet. Stärkere Anhäufung kommt in den Böden der gemäßigten Zone, bis zur Bodentiefe von 20 cm, insbesondere in der Rhizosphäre bei Hafer und Gerste vor. Der Pilz besitzt hohe Bindungsfähigkeit bei der Krümelbildung. Er produziert größere Mengen von Pantothensäure und Pyridoxin. MARTIN und HAIDER (1969) fanden im Kulturmedium, vorwiegend aber im Mycel von S. chartarum, huminstoffähnliche Substanzen. Der in den Versuchen verwendete Stamm von S. chartarum (C 805) stammt aus der Sammlung von K.H. DOMSCH, Institut für Bodenbiologie der Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig.

2.2 Tonminerale =====

Mit Rücksicht auf die Ergebnisse einer ganzen Reihe von in der Einleitung erwähnten Arbeiten wurden zwei in ihren Eigen-

schaften stark unterschiedliche Tonminerale gewählt - Montmorillonit und Kaolinit. Beide stammen aus der Sammlung von H.W. VAN DER MAREL, Laboratorium für Bodenmechanik, Delft, Niederlande.

Die mineralogische Charakteristik des Montmorillonits (Probe 104, Bed Rock, Wyoming) ist den Abb. 4 und 5 zu entnehmen.

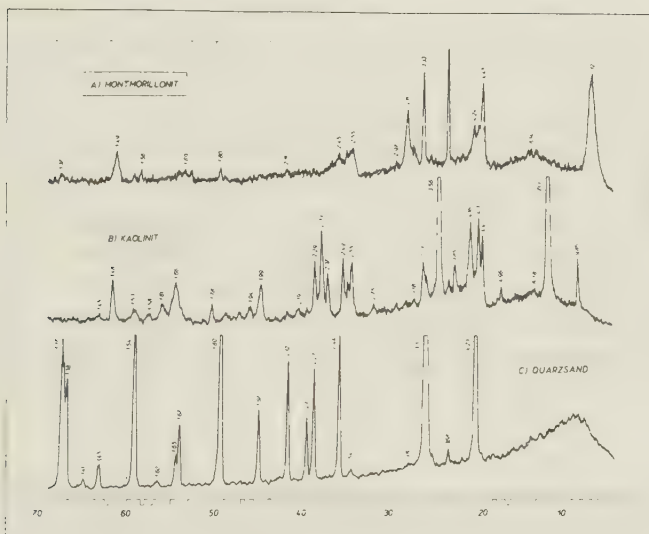


Abb. 4: Röntgenbeugungsspektren des verwendeten Montmorillonits, Kaolinitis und Quarzsandes

Die Röntgenbeugungen (Abb. 4A) zeigen, daß es sich um eine Tonfraktion handelt, die vorwiegend aus reinem Montmorillonit besteht. Die Aufweitung der Gitterschichten beträgt etwa 12,0 Å. Das Infrarotspektrum (Abb. 5A) zeigte schwache, für Montmorillonit charakteristische Doppelbanden bei 9,7 μ und weitere Absorptionsbanden bei 10,9, 11,3 und 12,55 μ . Die durch Röntgenspektroanalyse festgestellte Elementarzusammensetzung ist in der Tab. 1 angegeben. Die Sorptionskapazität dieses Minerals lag bei 97 meq/100 g.

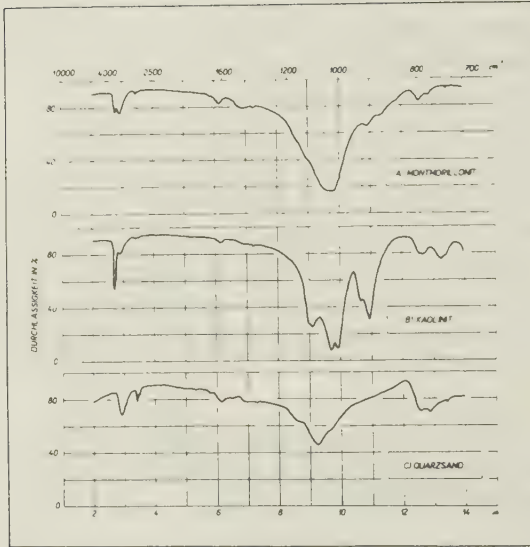


Abb. 5: Infrarotspektren des verwendeten Montmorillonits, Kaolinit und Quarzsandes

Tab. 1: Elementarzusammensetzung der verwendeten Tonminerale (in %).

Mineral	10^1	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Montmorillonit	Si	Al, Fe	K, Ca, Ti	Ni, Cu, Zn	Mn
Kaolinit	Si, Al	Fe	Ca, Na, K, Ti	Mg	

Die mineralogische Charakteristik des Kaolinit (Probe 163, Cornwall, England) ist den Abbildungen 4B und 5B zu entnehmen.

Die Röntgenbeugungen zeigen, daß dieses Mineral bis auf geringe Muscovit-Beimischungen fast rein ist. Das Infrarotspektrum zeigt die für Kaolinit charakteristischen Absorptionsbanden bei 8,97 und 9,10 μ , eine typische Doppelbande bei 9,70 und 9,92 μ und weitere Banden bei 10,66 und 10,93 μ . Die Absorptionsbanden bei 2,72, 2,73 und 2,76 μ liegen im Bereich der OH-Valenzschwingungen. Die Elementarzusammensetzung des Minerals ist in der Tab. 1 angegeben. Die Sorptionskapazität lag bei 20 meq/100 g.

Neben der kolloidalen Fraktion der Tonminerale kann durch Verwitterungsprozesse auch Quarz im kolloidalen Zustand im Boden vorkommen. Dieser unterscheidet sich von den Tonmineralen durch den einheitlichen Bau des Kristalls aus Silicium-Sauerstoff-Tetraedern; weiterhin ist er chemisch stabiler als die beiden vorhergenannten Minerale und beim Anfeuchten bleibt sein Volumen unverändert. Als Vergleichsmaterial zu den Tönen wurde daher in den Versuchen fein verriebener Quarzsand von der Korngröße 0,02 mm verwendet. Die röntgenographische Charakteristik ist in der Abb. 4C gezeigt. Das IR-Spektrum des Quarzsandes (Abb. 5C) zeigt charakteristische Absorptionsbanden bei 8,6 und 9,25 μ , wie auch bei 12,55 und 12,85 μ .

Die zwei Tonminerale und der Quarzsand wurden mit 0,25, 0,5 bzw. 1,0 Gewichtsprozenten den einzelnen Versuchsvarianten zugesetzt und mit der Nährlösung bei 120°C zusammen sterilisiert. Als Kontrolle diente eine Variante ohne Mineral-Zusatz.

2.3 Kultivierungsbedingungen

Die beiden mikroskopischen Bodenpilze wurden auf einem synthetischen Nährmedium gezüchtet, das von MARTIN et al. (1967) vorgeschlagen wurde. Die Zusammensetzung der Nährlösung war folgende: 30 g Glukose • H_2O ; 5 g Asparagin; 0,1 g Hefeextrakt (Difco); 1,6 g KH_2PO_4 ; 0,9 g KCl; 0,5 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in 1 Liter Leitungswasser. Der pH-Wert der Nährlösung wurde auf 6,0 eingestellt.

Die Kultivierung der Pilze wurde in Schüttel- und Standkulturen vorgenommen. Für die Schüttelkulturen wurden 1 l-Rundkolben benutzt, die mit 300 ml Nährlösung und dem jeweiligen Mineralzusatz beschickt waren. Für die Standkulturen wurde die gleiche Menge an Nährlösung und Mineralzusätzen in 2 l-Fernbach-Kolben eingefüllt. Die Versuchsgefäße wurden mit je 2 ml einer einheitlichen Sporensuspension von fünf Tage alten Pilzkulturen beimpft. Die beimpften Kolben waren mit Wattestopfen verschlossen und das Wachstum der Pilze erfolgte in einem Brutraum bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Die Rundkolben wurden auf einem Schütteltisch mit 100 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Aufgrund der Vorversuche wurde die Gesamtdauer der Kultivierung mit 30 Tagen begrenzt.

2.4 Analytische Methoden

=====

Zur Sicherung der analytischen Ergebnisse wurden die Versuchsvarianten in neun Parallelen angesetzt. Je drei Parallelkulturen wurden nach 10, 20 und 30 Tagen abgebrochen, aufgelöst, vereinigt und analysiert. Die Einheitlichkeit der Versuchsergebnisse wurde weiterhin durch genaue Einhaltung der Kulturbedingungen gewährleistet. Diese hatte zur Folge, daß sich keine wesentlichen visuellen Unterschiede im Pilzwachstum in einzelnen Parallelen beobachten ließen. Daher war es möglich, die Parallelkulturen für die Analysen zu vereinigen und sie nicht einzeln zu analysieren. Wiederholungen von Gesamtversuchen ergaben keine wesentlichen Abweichungen.

Zur Bestimmung der Biomasse wurde der Inhalt der Kolben bei 5000 g abzentrifugiert und der Rückstand bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet. Eine geringe Menge der Minerale, vor allem Montmorillonit, die nach der Zentrifugation bei 5000 g als schwache Trübung im Überstand verblieb, wurde an-

schließlich bei aliquoten Mengen mit 14 000 g abzentrifugiert und nach Trocknung bei 105°C gewichtsmäßig ermittelt. Dieser mengenmäßig unwesentliche Anteil wurde dem Rückstand (Mycel + zugegebenes Mineral) zugerechnet. Zur Ermittlung der reinen Biomasse wurde die Menge des zugesetzten Minerals vom getrockneten Rückstand abgezogen. Es wurde auch die mögliche Sorption von Nährstoffen aus der Nährlösung durch Tonminerale überprüft, da diese im Gewicht der "Biomasse" nach Abzug des Mineralzusatzes verbleiben würden und so die wirklich vom Pilz gebildete Zellmasse verfälschen könnte. Dazu wurde die sterile Nährlösung mit dem jeweiligen Zusatz von Tonmineralen 24 Stunden geschüttelt, dann abzentrifugiert und der Rückstand nach Trocknung gewogen. Es zeigten sich dabei keine nennenswerten Änderungen im Gewicht der zugesetzten Tonminerale. Analysen des Überstandes hinsichtlich der zugesetzten Nährstoffe zeigten ebenfalls, daß keine Änderung in der Zusammensetzung stattgefunden hatte.

Die Analyse der gebildeten Huminstoffe beschränkte sich auf Huminsäuren und Fulvosäuren. Es wurden insgesamt drei Huminsäure- und zwei Fulvosäure-Fractionen bestimmt. Die Lösungshuminsäuren wurden durch direktes Ansäuern der abzentrifugierten Nährlösung mit 1 n H_2SO_4 bei pH 2 ausgefällt. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlages wurde der Rückstand gegen die 1000-fache Menge dest. H_2O 48 Stunden dialysiert. Das Wasser wurde dabei mehrmals umgetauscht. Nach der Dialyse wurden die Huminsäuren gefriergetrocknet und ausgewogen. Diese Fraktion der Huminsäuren wird als HS_1 bezeichnet. Da es möglich war, daß im Überstand immer noch Reste der zugesetzten Glukose, bzw. des Asparagins zu finden sind, wurde darauf verzichtet, die nicht fällbaren Polymerisations-Produkte (Fulvosäure- FS_1) in der Lösung zu bestimmen. Die zweite Fraktion der Huminsäuren und Fulvosäuren wurde durch 24-stündige Extraktion des getrockneten und feinverriebenen Pilz-Mycels mit 0,5 n kalter NaOH gewonnen. Hierbei wurden 1,5-2 g des Gemisches aus Pilzmycel und Tonmineral mit 150 ml 0,5 n NaOH extrahiert. Danach wurden mineralische Kolloide durch Zusatz von 40 ml gesättigter

Natriumsulfat-Lösung gefällt und der gesamte Rückstand bei 5000 g abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die Huminsäuren durch Zugabe von 1 n H_2SO_4 (bis pH 2) ausgefällt. Die abzentrifugierte Huminsäurefraktion wurde in gleicher Weise, wie die HS_1 -Fraktion dialysiert und gefriergetrocknet. Die so gewonnene Huminsäure-Fraktion wird als HS_2 bezeichnet. Die nicht fällbare Fraktion im sauren Überstand wurde als 2. Fraktion der Fulvosäuren (FS_2) bezeichnet.

Die Huminstoffe der dritten Fraktion (HS_3 , FS_3) wurden durch ein gleiches Extrahierungsverfahren gewonnen, jedoch nach vorheriger Hydrolyse des Mycels. Das Mycel wurde dabei mittels 1 n H_2SO_4 zwei Stunden bei 90°C hydrolysiert. Um den reinen Anteil der HS_3 - bzw. FS_3 -Fraktion festzustellen, wurden die vorher ermittelten HS_2 - bzw. FS_2 -Mengen von der Gesamtmenge immer abgezogen.

Der Aschegehalt der Huminsäure-Fractionen wurde durch 10-stündige Verbrennung des organischen Anteils bei 500°C bestimmt. Zur Bestimmung der Zusammensetzung des anorganischen Anteils wurden die Präparate der Huminsäuren durch 30 %iges H_2O_2 bis zur völligen Enträrbung oxydiert.

Die Summe der sauren Gruppen von Huminsäuren wurde nach DRAGUNOVA (1958) mittels BaCl_2 bestimmt. Die Carboxylgruppen wurden durch Zusatz von Calciumacetat nach KUCHARENKO (1937a, b) titrimetrisch erfaßt.

Die optische Dichte der Pilz-Huminsäuren wurde spektrophotometrisch bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Präparate von Huminsäuren in 0,02 n NaOH gelöst. Die Konzentration der Lösungen betrug 10 mg Huminsäure-Kohlenstoff pro 100 ml. Die Messungen wurden im Wellenlängen-Bereich von 350-675 nm (in 25 nm Intervallen) mit dem Spektrophotometer Zeiss PMQ II durchgeführt. Für die Berechnung des sog. Farbquotienten $Q_{4/6}$ wurden die Wellenlängen 475 nm und 650 nm gewählt. Zur graphischen Darstellung wurden die gemessenen

Extinktionswerte nach einem von VALLA (1967) beschriebenen Verfahren umgerechnet. Dabei wurden die Logarithmen der Extinktionswerte gegen die Wellenlänge aufgetragen und die logarithmische Extinktionskurve mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate auf eine Gerade gebracht. Um den gegenseitigen Vergleich der einzelnen Huminsäure-Präparate zu erleichtern, wurden die gemessenen Werte auf eine Grundextinktion von 0,900, bei einer Wellenlänge von 475 nm transponiert (VALLA, 1967). Es wurde sowohl der Farbquotient aus den gemessenen Extinktionen berechnet ($Q_{4/6}$), wie auch die aus dem Verlauf der logarithmischen Geraden gewonnenen Werte bei den gleichen Wellenlängen zur Berechnung der theoretischen Farbquotienten verwendet (theor. $Q_{4/6}$). Man kann annehmen, daß der theoretische $Q_{4/6}$ eine glaubwürdigere Angabe als der direkt bestimmte $Q_{4/6}$ darstellt, weil in dem theoretischen Quotient alle gemessenen Werte enthalten sind, während der direkt bestimmte $Q_{4/6}$ aus zwei Grenzwerten berechnet ist. Im Falle einer schwachen Farbtiefe von Huminsäure-Präparaten wurde nur der theoretische $Q_{4/6}$ angegeben.

Der Gesamtkohlenstoff-Gehalt von Pilz-Huminstoff-Fractionen wurde oxydimetrisch nach ALTEN et al. (1935) bestimmt. Der Gesamtstickstoff-Gehalt der Huminsäure-Fractionen vom Mycel und von der Nährlösung wurde nach dem Kjeldahl-Verfahren ermittelt. Ammonium-Stickstoff wurde mit Hilfe der von BREMNER (1965) angegebenen Methoden bestimmt. Die Glukose-Konzentration im Nährmedium wurde kolorimetrisch nach MOKRASCH (1954) analysiert. Die pH-Werte der Nährlösung wurden elektrometrisch gemessen.

Die infrarotspektroskopischen Untersuchungen der einzelnen Mineralien und des mineralischen Anteils der gebildeten Huminsäuren wurden mit dem Infrarotspektrophotometer (Fa. Leitz, Modell III) im Bereich von 2 bis 13 μ durchgeführt.

Die röntgenographischen Untersuchungen wurden mit dem Zählrohrgoniometer und dem Röntgengerät der Fa. C.H.F. Müller durchgeführt. Die Proben von Mineralen wurden vorher mit 4 Atü gepreßt und die Preßlinge untersucht.

Weitere methodische und analytische Verfahren werden wegen der besseren Übersichtlichkeit in den betreffenden Abschnitten der Versuchsergebnisse erwähnt.

3. VERSUCHSERGEBNISSE

=====

3.1 Einfluß von Tonmineralen auf die Bildung der Biomasse

=====

bei Epicoccum nigrum und Stachybotrys chartarum

=====

Die Bildung der Biomasse wurde in Schüttel- und Standkulturen bei Zusatz verschiedener Mengen von Montmorillonit, Kaolinit und Quarzsand in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Die Versuche liefen über 30 Tage. Die Biomasse wurde in Abständen von 10 Tagen bestimmt.

In Tab. 2 sind die Werte für die in Schüttel- und Standkulturen gebildete Biomasse durch E. nigrum bei Zugabe verschiedener Mengen an Montmorillonit gezeigt.

Tab. 2: Menge an Biomasse in Schüttel- und Standkulturen von E. nigrum bei Zusatz von verschiedenen Mengen an Montmorillonit
(Angaben in g Biomasse pro 1 Liter Nährlösung [in %])

S c h ü t t e l k u l t u r e n			
Zusatz	10. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontrolle	2,21 [100]	4,04 [100]	5,68 [100]
0,25 % Montm.	2,68 [121]	5,33 [132]	7,74 [136]
0,5 % Montm.	3,80 [172]	10,25 [254]	7,23 [127]
1,0 % Montm.	5,08 [230]	9,97 [247]	6,42 [113]
S t a n d k u l t u r e n			
Kontrolle	1,75 [100]	3,70 [100]	5,24 [100]
0,25 % Montm.	2,12 [121]	6,53 [176]	7,17 [137]
0,5 % Montm.	3,47 [198]	9,50 [257]	7,47 [143]
1,0 % Montm.	6,62 [378]	7,71 [208]	5,48 [105]

Aus Tab. 2 ist zu ersehen, daß sowohl in Schüttel- als auch in den Stand-Kulturen eine Erhöhung der Biomasse durch Montmorillonit-Zugabe eintritt. Mit steigender Ton-Konzentration erfolgte eine steigende Erhöhung der Biomasse; diese Erhöhung ist besonders ausgeprägt am 10. Tag. Zu diesem Zeitpunkt sind die mit Montmorillonit versetzten Varianten der Standkulturen um 21 %, 98 % bzw. 278 % höher als die Kontrolle. Während jedoch die Zuwachskurve bei der Kontrolle und der 0,25 %igen Zugabe von Montmorillonit von Anfang bis zum Ende der Kultivierung ständig zunahm, zeigten die Varianten mit höherem Montmorillonit-Zusatz (0,5 % und 1 %) am 30. Tag einen Rückgang. Orientierungsmessungen zwischen dem 10. und 20. Tag bei 1 % Montmorillonitzugabe ergaben, daß das Maximum dazwischen liegt und am 20. Tag bereits eine Abnahme erfolgt ist.

Die durch die Bildung von Huminstoffen hervorgerufene Verfärbung des Kulturmediums trat vor allem in den Standkulturen auf, die aufgrund der Kulturbedingungen schlechter mit

Sauerstoff versorgt waren (siehe 3.3). Daher wurden die meisten weiteren Versuche nur noch in Standkulturen durchgeführt. In Tab. 3 ist der Einfluß von Kaolinit auf Standkulturen gezeigt. Gleichzeitig wurde auch fein verriebener Quarzsand in steigenden Mengen zugesetzt, um einen Vergleich von reinem Siliciumdioxid mit Tonmineralen zu erhalten.

Tab. 3: Menge an Biomasse in Standkulturen von E. nigrum bei Zusatz von verschiedenen Mengen an Kaolinit und Quarzsand
(g Biomasse pro 1 Liter Nährlösung [in %])

Zusatz	10. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontrolle	1,62 [100]	3,53 [100]	5,48 [100]
0,25 % Kaolin.	1,68 [104]	4,78 [135]	5,01 [91]
0,5 % Kaolin.	1,91 [118]	4,82 [137]	5,77 [105]
1,0 % Kaolin.	1,32 [81]	4,54 [129]	5,11 [93]
Kontrolle	1,62 [100]	3,53 [100]	5,48 [100]
0,25 % Quarz	2,16 [133]	5,03 [142]	5,63 [103]
0,5 % Quarz	2,92 [180]	4,73 [134]	5,62 [103]
1,0 % Quarz	2,27 [140]	4,08 [116]	5,57 [102]

Aus Tab. 3 ist ersichtlich, daß Kaolinit und Quarzsand die Menge an Biomasse nicht so stark wie Montmorillonit beeinflussen. Bei dem höchsten Zusatz von Kaolinit am 10. Tag sogar ein gewisser Hemmeffekt zu beobachten. Bei den niederen Konzentrationen wirken aber auch diese Minerale auf die Zuwachsrates. Diese steigt allgemein bis zum 30. Tag an.

Um festzustellen, ob der Einfluß der Tonminerale nur bei dem direkten Kontakt des Organismus mit dem Mineral auftritt, wurde eine Versuchsserie durchgeführt, bei der die Minerale in verschlossene Dialysierschläuche untergebracht waren. Hier wurde nur ein 0,5 %iger Zusatz der Minerale

angewendet. Um einen besseren Austausch zwischen dem Kulturmedium und den Mineralen zu erzielen, wurde der Pilz diesmal nur unter Schüttelbedingungen gezüchtet. Die Werte für die Biomasse sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Tab. 4: Menge an Biomasse in Schüttelkulturen von E. nigrum bei Zusatz verschiedener Minerale in Dialysierschläuchen
(g Biomasse pro 1 Liter Nährlösung [in %])

Zusatz	10. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontrolle	2,74 [100]	3,80 [100]	6,11 [100]
0,5 % Montm.	4,23 [154]	10,86 [286]	5,22 [85]
0,5 % Kaolin.	2,13 [78]	4,52 [119]	6,60 [108]
0,5 % Quarz	2,72 [99]	4,91 [129]	6,26 [102]

Trotzdem die Minerale in Dialysierschläuche eingeschlossen waren, zeigte auch hier Montmorillonit eine ähnliche Wirkung wie bei direktem Kontakt. Bei Kaolinit- und Quarzsandzusatz zeigen sich kaum Unterschiede bei dem Vergleich mit der Kontroll-Variante. Dies steht mit den Werten in Tab. 3 nicht vollständig in Einklang.

Da die Versuche mit E. nigrum zeigten, daß die Huminstoffbildung vor allem unter den Bedingungen der Standkulturen erfolgte, wurden auch die Versuche mit S. chartarum nur in Standkulturen durchgeführt. Die Erträge für die Biomasse bei diesem Organismus sind nach Zusatz von Montmorillonit, Kaolinit und Quarzsand in Tab. 5 zusammengestellt. Bei diesen Versuchen wurde Montmorillonit in den üblichen Konzentrationen von 0,25 %, 0,5 % und 1 % zugegeben, während Kaolinit und Quarzsand nur in einer Konzentration von 0,5 % zugesetzt waren.

Tab. 5: Menge an Biomasse in Standkulturen von S. chartarum bei Zusatz von Montmorillonit, Kaolinit und Quarzsand in einem Asparagin-Glukose-Medium (g Biomasse pro 1 Liter Nährlösung [in %])

Zusatz	10. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontrolle	3,55 [100]	10,27 [100]	8,74 [100]
0,25 % Montm.	3,05 [86]	7,01 [68]	8,52 [97]
0,5 % Montm.	3,73 [105]	10,62 [103]	9,09 [104]
1,0 % Montm.	5,66 [159]	11,27 [110]	8,36 [96]
0,5 % Kaolin.	3,46 [97]	10,81 [105]	10,43 [119]
0,5 % Quarz	3,38 [95]	10,29 [100]	8,95 [102]

Gegenüber E. nigrum, bei dem der Montmorillonit-Zusatz einwandfrei immer eine Förderung der Biomasse innerhalb des angewandten Konzentrationsbereichs hatte, zeigte dieser Zusatz bei S. chartarum in der niedrigen Konzentration eine Hemmung (14 % am 10. Tag, bzw. 32 % am 20. Tag). Bei 0,5 %iger Zugabe entspricht die Biomasse etwa der der Kontrolle, jedoch bei 1 %iger Zugabe liegt sie höher (um 59 % am 10. Tag). Auch der Zusatz von 0,5 % Kaolinit oder 0,5 % Quarzsand erbrachte keine ausgeprägten Unterschiede zur Kontroll-Variante. Diese Erscheinungen kamen auch bei den weiteren analytischen Untersuchungen über Nährstoffaufnahme und Huminstoffproduktion zum Ausdruck.

Die bisherigen Untersuchungen über die Bildung der Biomasse zeigten eine Beeinflussung, die hauptsächlich durch Montmorillonit und weniger durch Kaolinit erfolgte. Zur weiteren Klärung der unterschiedlichen Einflüsse (Tab. 2 und 3 gegenüber Tab. 5) wurde die Bilanz der Glukose und des Stickstoffs im Medium ermittelt.

3.2 Einfluß von Tonmineralen auf die Nährstoffbilanz bei

E. nigrum und S. chartarum unter verschiedenen Kulti-

vierungsbedingungen

Als hauptsächliche Energiequelle war den Nährlösungen Glukose zugegeben, deren Verbrauch während des Wachstums von E. nigrum in Tab. 6 dargestellt ist. Den Lösungen war 30 g Glukose pro Liter Medium zugesetzt worden.

Tab. 6: Verbrauch der Glukose durch E. nigrum in Schüttel- und Standkulturen bei Montmorillonitzusatz
(g verbrauchter Glukose pro 1 Liter Nährlösung)

S c h ü t t e l k u l t u r e n

Zusatz	10. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontrolle	8,75	15,29	14,68
0,25 % Montm.	8,32	23,08	29,36
0,5 % Montm.	10,04	29,72	29,28
1,0 % Montm.	12,35	29,52	29,26

S t a n d k u l t u r e n

Kontrolle	5,66	8,66	14,53
0,25 % Montm.	7,46	25,88	29,31
0,5 % Montm.	10,90	25,51	29,35
1,0 % Montm.	16,00	29,42	29,36

Ähnlich wie die Biomasse, steigt auch der Glukoseverbrauch mit steigendem Montmorillonitzusatz. Nach einer Kultivierungsdauer von 20 Tagen ist bei dem Zusatz von 0,5 und 1 % Montmorillonit die Glukose bereits verbraucht. Dies spiegelt sich auch in der Biomasse (Tab. 2) wider, die danach eine abnehmende Tendenz hat.

Bestimmungen des Glukose-Verbrauchs bei den Kulturen, denen Kaolinit oder Quarzsand zugegeben worden war, zeigen die gleiche Tendenz wie die Wachstumskurven. So war am 10. Tage

ein etwas höherer Glukose-Verbrauch bei den mit Quarzsand versetzten Proben, als bei den mit Kaolinit versetzten Proben zu beobachten. Auch die Kulturen, bei denen die Minerale in Dialysierschläuche eingeschlossen waren, ordnen sich den in Tab. 6 aufgeführten Ergebnissen ein. Auch hier zeigten die mit Montmorillonit versetzten Proben eine wesentlich schnellere Umsetzung der Glukose.

In Tab. 7 ist der Glukose-Verbrauch von S. chartarum Standkulturen bei Zusatz von Montmorillonit und Quarzsand angegeben.

Tab. 7: Verbrauch der Glukose durch S. chartarum in Standkulturen bei Zusatz von Montmorillonit, Kaolinit und Quarzsand
(g verbrauchte Glukose pro 1 Liter Nährlösung)

Zusatz	10. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontrolle	6,28	28,90	29,63
0,25 % Montm.	5,47	17,77	27,80
0,5 % Montm.	6,32	28,13	29,67
1,0 % Montm.	10,48	29,53	29,53
0,5 % Kaolin.	6,27	29,53	29,53
0,5 % Quarz	5,80	29,67	29,70

Die in Tab. 5 gezeigte Hemmung oder Förderung in der Bildung der Biomasse drückt sich auch im Glukose-Verbrauch aus. Gegenüber E. nigrum ist bei Montmorillonit-Zusatz zu S. chartarum in einem Asparagin-Glukose-Medium der Verbrauch der Glukose mit steigender Zugabe nicht so stark gefördert.

Für die Berechnung der Wirksamkeit der Umwandlung einer Kohlenstoffquelle in Biomasse wird oft der sogenannte "ökonomische Koeffizient" angegeben (Biomasse in g Trockengewicht x 100 pro verbrauchter Kohlenstoffquelle in g). Wendet man diese Berechnung auf die E. nigrum-Kulturen

für die verbrauchte Glukose an, so bekommt man die in Tab. 8 angegebenen Werte.

Tab. 8: Ökonomische Koeffizienten für E. nigrum in Schüttelkulturen bei Zusatz verschiedener Montmorillonitmengen

Zusatz	10. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontrolle	25,26	26,42	38,69
0,25 % Montm.	32,21	23,09	26,36
0,5 % Montm.	37,85	34,49	24,69
1,0 % Montm.	41,13	33,77	21,94

Die ökonomischen Koeffizienten für die Schüttelkulturen liegen besonders für die Quotienten des 10. und 20. Tages höher als die der Kontrolle. Sie steigen fast regelmäßig mit steigendem Montmorillonitzusatz an. Am 20. Tage ist die Glukose besonders bei den höheren Tonkonzentrationen bereits aufgebraucht.

Danach finden autolytische Prozesse statt, die sich in einer Erniedrigung der Koeffizienten widerspiegeln. Ähnlich, aber nicht so ausgeprägt, liegen die Werte der Koeffizienten für die Standkulturen (Tab. 9). Auch hier wurden die höchsten Werte des Verhältnisses aus gebildeter Biomasse und verbrauchter Glukose bei der höchsten Montmorillonitkonzentration gefunden.

Weiterhin wurden die Werte der ökonomischen Koeffizienten für E. nigrum und S. chartarum mit Montmorillonit-, Kaolin- und Quarzsandzusatz berechnet. Es wurden hier nur die Koeffizienten vom 10. Tag gezeigt, d.h. von der Periode der raschesten Zunahme der Biomasse.

Tab. 9: Ökonomische Koeffizienten für E. nigrum und S. chartarum in Standkulturen bei Zusatz von Montmorillonit, Kaolinit und Quarzsand (nach 10 Tagen)

M o n t m o r i l l o n i t				
Organismen	Kontrolle	0,25 %	0,5 %	1 %
<u>E. nigrum</u>	29,2	28,4	31,8	41,4
<u>S. chartarum</u>	56,3	55,7	59,0	59,3
K a o l i n i t				
<u>E. nigrum</u>	29,2	27,2	20,2	17,4
<u>S. chartarum</u>	56,3	-	55,2	-
Q u a r z s a n d				
<u>E. nigrum</u>	29,2	27,3	17,6	20,6
<u>S. chartarum</u>	56,3	-	58,3	-

Die in Tab. 9 wiedergegebenen Koeffizienten zeigen bei Montmorillonit für beide Organismen einen Anstieg. Für Kaolinit und Quarzsand liegen diese Koeffizienten von E. nigrum niedriger bzw. bei S. chartarum etwa gleich.

In den gleichen Zeitabständen von 10 Tagen wurde auch der Gesamtstickstoff und die Ammoniakbildung im Nährmedium gemessen. Um über die effektive Ausnutzung des Stickstoffs einen Überblick zu bekommen, sind in Tab. 10 und 11 nur die Werte für den in das Mycel eingebauten Gesamtstickstoff und die Werte für die Ammoniakbildung im Nährmedium bei E. nigrum wiedergegeben. Neben diesen Werten sind in Klammern die Werte in Prozenten des den Nährmedien in Form von Asparagin zugesetzten Stickstoffs angegeben (870 mg N pro 1 Liter Medium).

Tab. 10: Einbau des Stickstoffs in das Mycel bei E. nigrum in den Schüttelkulturen und Bildung von Ammoniak im Medium
(Angaben in mg N pro 1 Liter [in % des Anfangs-N])

Montm.	Zusatz	10. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontrolle	Myc-N	105 [12]	229 [26]	270 [31]
	NH ₃ -N	0	32 [4]	36 [4]
0,25 %	Myc-N	126 [15]	229 [34]	346 [40]
	NH ₃ -N	0	44 [5]	289 [33]
0,5 %	Myc-N	184 [21]	589 [68]	338 [39]
	NH ₃ -N	0	58 [7]	359 [41]
1,0 %	Myc-N	242 [28]	577 [64]	305 [35]
	NH ₃ -N	0	101 [12]	274 [32]

Tab. 11: Einbau des Stickstoffs in das Mycel bei E. nigrum in Standkulturen und Bildung von Ammoniak im Medium
(Angaben in mg pro 1 Liter [in % des Anfangs-N])

Montm.	Zusatz	10. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontrolle	Myc-N	82 [9]	199 [23]	254 [29]
	NH ₃ -N	0	0	0
0,25 %	Myc-N	96 [11]	364 [42]	342 [39]
	NH ₃ -N	0	0	210 [24]
0,5 %	Myc-N	165 [19]	557 [64]	349 [40]
	NH ₃ -N	0	43 [5]	164 [19]
1,0 %	Myc-N	289 [33]	427 [49]	264 [30]
	NH ₃ -N	0	163 [19]	195 [32]

Im Zusammenhang mit der erhöhten Bildung von Biomasse steht der raschere Einbau von Stickstoff. Während jedoch bei den Kontroll- und den 0,25 %-Varianten ein ständiger Anstieg des Stickstoffeinbaues über 30 Tage erfolgt, nimmt der Gesamtstickstoff im Mycel bei den 0,5- und 1 %-Varianten am

30. Tage ab. Bei den letzten Varianten erscheint auch Ammoniak früher und in höherer Konzentration in der Nährlösung. Da die Glukose bei diesen Varianten bereits am 20. Tage verbraucht ist, tritt das Mycel in stärkere Autolyse ein. Die Werte für den freigesetzten Ammoniak liegen wahrscheinlich besonders bei den 1 %-Varianten zu niedrig, da der pH der Nährlösung am 30. Tage bei 8 lag und daher mit dem Entweichen von Ammoniak gerechnet werden konnte. Bei den 1 %-Varianten zeigte sich außerdem, daß das Wachstumsmaximum in den Schüttel- und Standkulturen zwischen dem 10. und 20. Tage liegt, da hier die Ammoniak-Konzentration in den Nährlösungen höher ist als bei den 0,5 %-Varianten.

Setzt man ähnlich, wie bei der Berechnung der ökonomischen Koeffizienten den Stickstoffeinbau ins Verhältnis mit der verbrauchten Glukose, so erhält man bei den Montmorillonit-varianten höhere Quotienten als bei den Kontrollen.

Bei der Zugabe von Kaolinit oder Quarzsand war die Erhöhung der Biomasse nicht so ausgeprägt, wie bei Montmorillonitzugabe. Der Einbau von Stickstoff in das Mycel war hier dementsprechend auch nicht so stark erhöht. Bei den Kulturen, denen die Minerale im Dialysierschlauch eingeschlossen zugegeben waren, trat ein erhöhter Stickstoffeinbau nur bei den Kulturen mit Montmorillonitzugabe ein.

Die Angaben für den Einbau von Stickstoff in das Mycel von S. chartarum und die Freisetzung von Ammoniak in das Kulturmedium befinden sich in Tab. 12.

Tab. 12: Einbau von Stickstoff in das Mycel von S. chartarum bei Zusatz von Montmorillonit, Kaolinit und Quarzsand
(Angaben in mg pro 1 Liter [in % des Anfangs-N])

Zusatz		10. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontrolle	Myc-N	144 [17]	480 [55]	444 [51]
	NH ₃ -N	0	0	170 [20]
O,25 %	Myc-N	122 [14]	306 [35]	407 [47]
Montm.	NH ₃ -N	0	0	0
O,5 %	Myc-N	149 [17]	497 [57]	451 [52]
Montm.	NH ₃ -N	0	0	165 [19]
1,0 %	Myc-N	227 [26]	471 [54]	456 [53]
Montm.	NH ₃ -N	0	89 [10]	307 [35]
O,5 %	Myc-N	141 [16]	517 [59]	529 [61]
Kaolin.	NH ₃ -N	0	139 [16]	251 [29]
O,5 %	Myc-N	136 [17]	494 [57]	477 [55]
Quarz	NH ₃ -N	0	192 [22]	252 [29]

Der Montmorillonit-Zusatz zu S. chartarum-Kulturen zeigte keine so ausgeprägte Förderung der Biomasse-Bildung (vgl. Tab. 5), wie bei den E. nigrum-Kulturen (vgl. Tab. 2). Bei der O,25 % M-Variante war sogar eine schwache Hemmung zu verzeichnen, jedoch bei den 1 % Montmorillonit-Varianten eine Förderung. Dies zeigte sich auch im Stickstoff-Verbrauch und in der Bildung von Ammoniak.

Das frühere Einsetzen der Ammoniak-Ausscheidung bei der Montmorillonit-Zugabe spiegelte sich auch im Gang der pH-Kurven wider. Der Gang der pH-Werte in den Nährlösungen von E. nigrum für die Schüttel- und Standkulturen mit Montmorillonit-Zusatz ist in der Tab. 13 gezeigt. Die Nährlösungen waren vor der Beimpfung auf pH 6 abgepuffert. Durch die Fähigkeit der Tonminerale zur Sorption von Kationen ist noch ein zusätzliches abpufferndes System den Nährlösungen zugesetzt worden.

Tab. 13: Verlauf der pH-Werte in Schüttel- und Standkulturen von E. nigrum bei Montmorillonit-Zusatz

S c h ü t t e l k u l t u r e n				
Zusatz	0. Tag	10. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontrolle	6,0	5,5	5,2	5,5
0,25 % Montm.	6,0	5,2	4,6	7,7
0,5 % Montm.	6,0	4,7	6,8	8,2
1,0 % Montm.	6,0	5,0	7,2	8,0
S t a n d k u l t u r e n				
Kontrolle	6,0	5,6	5,9	6,6
0,25 % Montm.	6,0	5,0	4,4	7,2
0,5 % Montm.	6,0	5,1	5,1	7,2
1,0 % Montm.	6,0	4,9	7,0	7,6

Von MARTIN et al. (1967) wurde für die Kulturen von E. nigrum für den Verlauf des pH-Wertes in den Nährlösungen erst ein Abfall des pH-Wertes und dann ein Anstieg in dem schwach alkalischen Bereich beobachtet. Dieselbe Erscheinung ist auch bei Montmorillonit-Zusatz zu verzeichnen. Mit steigendem Zusatz dieses Minerals sinkt der pH-Wert schneller und nimmt dann auch wiederum schneller zu. Der Zusatz von Montmorillonit ändert also nicht die pH-Kurve als solche, sondern drängt sie nur auf einen kürzeren Zeitabschnitt zusammen.

Nach weiteren Befunden von MARTIN et al. (1967, 1969) steht die Bildung von Huminstoffen durch E. nigrum und S. chartarum im Zusammenhang mit der Nährstoff-Umsetzung und dem Gang der pH-Kurve. Die Bildung der polymeren Huminstoffe erfolgt erst im neutralen bis schwach alkalischen Bereich. Im nächsten Abschnitt ist daher gezeigt, wie die Huminstoffbildung in Anwesenheit von Tonmineralen verläuft.

3.3 Einfluß von Tonmineralen auf die Huminstoffbildung durch

E. nigrum und S. chartarum

Während der Kultivierung von E. nigrum und anderen huminstoffbildenden Pilzen verfärbt sich die Lösung nach etwa 15 bis 20 Tagen zunächst rotbraun und nimmt später eine tiefbraune Farbe an. Bei den mit Montmorillonit versetzten Proben setzte die Verfärbung früher ein und die Nährlösungen waren mit steigender Konzentration des Tonminerals tiefer gefärbt. Dies war sowohl bei den Schüttel- als auch bei den Standkulturen der Fall, jedoch waren letztere wesentlich stärker gefärbt als die Schüttelkulturen. In Abb. 6 ist die Extinktion der zentrifugierten Nährlösungen von Schüttelkulturen bei 475 nm und 1 cm Schichtdicke bei steigendem Montmorillonit-Zusatz angegeben.

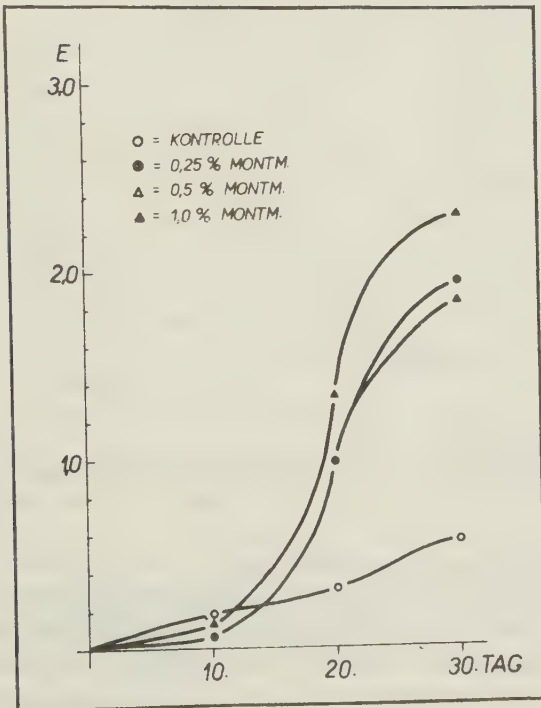


Abb. 6: Extinktion der Nährlösung bei 475 nm von E. nigrum-Schüttelkulturen nach 30-tägiger Kultivierung

Aus Abb. 7 sind die entsprechenden Kurven für Standkulturen zu ersehen. Für die Messungen wurden die Lösungen entsprechend verdünnt und dann auf die in den Abb. 6 und 7 angegebenen Extinktionswerte umgerechnet.

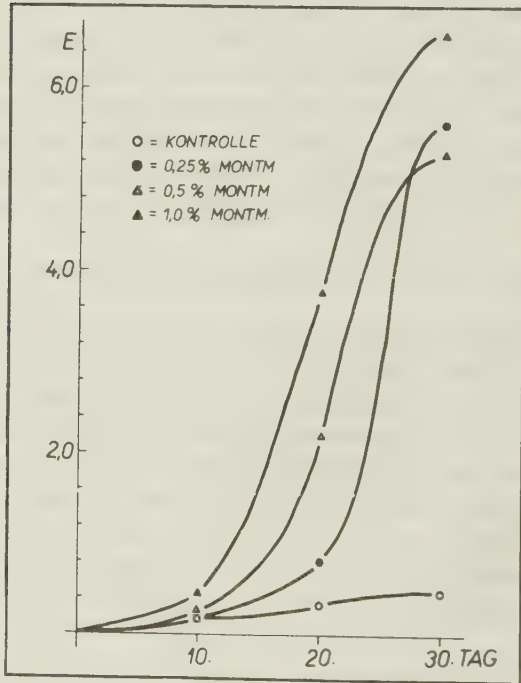


Abb. 7: Extinktion der Nährlösung bei 475 nm von E. nigrum Standkulturen nach 30-tägiger Kultivierung.

Unter beiden Kulturbedingungen ist in den Varianten mit Montmorillonit-Zusatz eine Steigerung der Extinktion zu beobachten. Bei den Standkulturen lag jedoch die Extinktion wesentlich höher als bei den Schüttelkulturen. Obwohl die Intensität der Färbung bereits ein gewisses Maß für die Menge an gebildeten Huminstoffen darstellen kann, ist es

jedoch nicht möglich, daraus direkte Mengenangaben vorherzusagen. Daher wurden die Huminstoffe aus den Lösungen durch Ansäuern gefällt und nach dem im methodischen Teil angegebenen Reinigungsverfahren mengenmäßig bestimmt. Die so gewonnenen Huminsäuren enthielten gewisse Mengen an Asche, die hauptsächlich vom zugesetzten Tonmineral stammte (siehe 3.4). Für einen objektiven Vergleich sind daher in Tab. 14 nicht die durch Wägung bestimmten Mengen an Huminsäuren angegeben, sondern die Angabe erfolgt in mg Kohlenstoff wie er aus den Präparaten oxydimetrisch ermittelt wurde.

Trotz der relativ starken Färbung der Nährlösungen von Schüttelkulturen liessen sich, wie Tab. 14 zeigt, keine Huminsäuren ausfällen. Dies muß nicht bedeuten, daß keine Huminstoffe in der Nährlösung vorhanden sind. Vielmehr liegen sie als nicht ausfällbare Huminsäurevorstufen (Fulvosäuren) vor. Daß der Pilz (E. nigrum) jedoch auch unter Bedingungen einer Schüttelkultur zur Bildung von Huminsäuren fähig ist, zeigen die Werte von HS_2 und HS_3 , wie auch von FS_2 . Bereits am 20. Tage findet man beträchtliche Mengen an Mycel-Huminstoffen in allen vier Varianten. Die einzelnen Fraktionen, wie auch die Summe der Huminstoffe liegen in den mit Montmorillonit versetzten Proben über den Kontrollvarianten. So gibt z.B. die in relativen Zahlen dargestellte Menge von HS_2 folgendes Bild:

Kontr.: 0,25 : 0,5 : 1 % Montm. = 1 : 34 : 95 : 102.

Rechnet man die gleichzeitig extrahierte Fulvosäuremenge der HS_2 -Menge zu, verändert sich das Verhältnis auf die Werte:

Kontr.: 0,25 : 0,5 : 1 % Montm. = 1 : 1,2 : 1,7 : 1,6,

was immer noch darauf hindeutet, daß in den Montmorillonit-Varianten im Durchschnitt eine um 50 % größere Menge an Huminstoffen der 2. Fraktion gebildet wurde.

Tab. 14: Bilanz der durch E. nigrum in Anwesenheit von Montmorillonit gebildeten Huminstoffen (Mengen-
angabe in mg C/1 l)

Zusatz von Montm.	Humin- stoffe (HSt)	Schüttelkulturen		Standkulturen	
		20. Tag	30. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontr.	HS ₁	0	0	0	50,4
	HS ₂	4,0	2,9	0	42,4
	HS ₃	138,2	160,8	0	0
	FS ₂	698,5	949,7	866,9	945,8
	FS ₃	0	0	0	0
	HS _{insg.}	142,2	163,7	0	92,8
	FS _{insg.}	698,5	949,7	866,9	945,8
	HSt _{insg.}	840,7	1113,4	866,9	1038,6
	HS ₁ :HS _{insg.}	0	0		0,54
	(HS ₂ +HS ₃):				
	:(FS ₂ +FS ₃)	0,20	0,17	0	0,04
	HS _{insg.} :				
	:FS _{insg.}	0,20	0,17	0	0,1
0,25 %	HS ₁	0	0	0	116,7
	HS ₂	135,5	117,1	275,4	304,6
	HS ₃	149,8	86,1	224,4	63,6
	FS ₂	726,5	599,8	700,0	577,9
	FS ₃	0	0	0	0
	HS _{insg.}	285,3	203,2	499,8	484,9
	FS _{insg.}	726,5	599,8	700,0	577,9
	HSt _{insg.}	1011,8	803,0	1199,8	1062,8
	HS ₁ :HS _{insg.}	0	0		0,24
	(HS ₂ +HS ₃):				
	:(FS ₂ +FS ₃)	0,39	0,34	0,71	0,64
	HS _{insg.} :				
	:FS _{insg.}	0,39	0,34	0,71	0,84

Fortsetzung Tab. 14

Zusatz von Montm.	Huminstoffe (HSt)	Schüttelkulturen		Standkulturen	
		20. Tag	30. Tag	20. Tag	30. Tag
0,50 %	HS ₁	0	0	88,3	213,5
	HS ₂	381,2	82,7	376,9	324,2
	HS ₃	259,8		187,9	0
	FS ₂	794,3	357,2	888,2	550,5
	FS ₃	0	0	0	0
	HS _{insg.}	641,0	82,7	653,1	537,7
	FS _{insg.}	794,3	357,2	888,2	550,5
	HSt _{insg.}	1435,3	439,9	1541,3	1088,2
	HS ₁ :HS _{insg.}	0	0	0,14	0,40
	(HS ₂ +HS ₃):				
	:(FS ₂ +FS ₃)	0,81	0,23	0,64	0,59
	HS _{insg.} :				
	:FS _{insg.}	0,81	0,23	0,74	0,98
1,0 %	HS ₁	0	0	356,2	285,2
	HS ₂	409,3	131,4	132,8	154,7
	HS ₃	60,5	0	8,6	15,9
	FS ₂	689,9	297,9	439,5	224,7
	FS ₃	0	0	0	0
	HS _{insg.}	469,8	131,4	497,6	456,4
	FS _{insg.}	689,9	297,9	439,5	224,7
	HSt _{insg.}	1159,7	429,3	937,1	681,1
	HS ₁ :HS _{insg.}	0	0	0,71	0,62
	(HS ₂ +HS ₃):				
	:(FS ₂ +FS ₃)	0,68	0,44	0,32	0,76
	HS _{insg.} :				
	:FS _{insg.}	0,68	0,44	1,13	2,03

Die wesentliche Änderung der Relativwerte bestätigt weiterhin, daß die Gesamtbilanz dieser Huminstofffraktion stark durch die Fulvosäuren beeinflusst ist. Die in der Tab. 14 gezeigten Werte der $HS_{\text{insg.}}:FS_{\text{insg.}}$ -Verhältnisse deutet jedoch darauf hin, daß der relative Anteil der Fulvosäuren mit steigender Montmorillonit-Konzentration sinkt. In den Montmorillonit-Varianten ist eine Zunahme an Huminsäuren zu beobachten, die mit steigender Tonzugabe immer deutlicher ist. Die ziemlich große Menge von HS_3 in allen Versuchsvarianten zeigt, daß im Pilzmycel ein bedeutender Anteil an huminsäureähnlichen Stoffen vorhanden ist, der durch einfache Extrahierung mit 0,5 n NaOH nicht zu isolieren ist, sondern erst nach vorheriger saurer Hydrolyse des Mycels. Diese dritte Fraktion von Huminstoffen stellt auch ein Gemisch von Huminsäuren mit Fulvosäuren dar, rechnet man jedoch die FS_2 -Menge ab, so ist FS_3 gleich Null. In den verschiedenen Varianten stand die gebildete HS_3 -Menge dann im Verhältnis:

Kontr.: 0,25 : 0,5 : 1 % Montm. = 1 : 1,1 : 1,9 : 0,4.

Die Gesamtmenge an Huminstoffen ist in der Variante mit 0,25 % Montmorillonit am 20. Tage der Inkubation um 20 % in der Variante mit 0,5 % Montmorillonit, um 71 %, und in der Variante mit 1 % Montmorillonit um 39 % höher gegenüber der Kontrolle. Am Ende der Kultivierung ist außer bei der Kontroll-Variante eine allgemeine Abnahme aller Fraktionen von Mycel-Huminstoffen zu beobachten, die sich dementsprechend in der Gesamtbilanz widerspiegelt.

Die intensive Braunfärbung der Nährlösung in den Standkulturen war nach den in Tab. 14 zusammengestellten Ergebnissen durch eine ziemlich starke Anhäufung von Huminsäuren verursacht. Im Gegensatz zu den Schüttelkulturen tritt diese erste Huminsäurefraktion verhältnismäßig stark auf. In den Varianten mit höherem Montmorillonit-Zusatz sind sie bereits am 20. Tage zu finden. Die an diesem Tage beobachtete Verteilung der einzelnen Fraktionen deutet darauf hin,

daß es zunächst zur Bildung der einfacheren Mycel-Fulvosäure (siehe Kontroll-Variante) kommt, dann zur Bildung der Huminsäuren im Mycel (siehe Variante mit 0,25 % Montmorillonit) und erst zuletzt zu einer Bildung bzw. Freisetzung der Huminsäuren in die Lösung. Die letztgenannte Fraktion steht am 30. Tage der Kultivation in den einzelnen Versuchsvarianten in einem Verhältnis:

Kontr.: 0,25 : 0,5 : 1 % Montm. = 1 : 2,3 : 4,2 : 5,7,

so daß die Montmorillonit-Variante gegenüber der Kontroll-Variante durchschnittlich um etwa 300 % höher liegt. Auch die Menge an Mycel-Huminsäuren (HS_2 und HS_3) sind in der Kontrolle am geringsten. Die Summe dieser zwei Fraktionen hat folgende Reihenfolge: 0,25 % Montm. $>$ 0,5 % Montm. $>$

$>$ 1 % Montm. Die Fraktion der Fulvosäuren steht in einem Verhältnis:

Kontr.: 0,25 : 0,5 : 1 % Montm. = 1 : 0,62 : 0,58 : 0,24,

d.h. daß mit steigendem Montmorillonitzusatz die Menge an Fulvosäuren stark abnimmt, was sich auch in den Verhältnissen $(HS_2 + HS_3) : (FS_2 + FS_3)$ widerspiegelt. Die Gesamtmenge an Huminsäuren erreichte ihr Maximum bei den Varianten mit dem Tonmineralzusatz, ähnlich wie bei den Schüttelkulturen, bereits am 20. Tage. Bei der Kontrollvariante sind hier nur Fulvosäuren vorhanden. Am 30. Tage übersteigt dann die an Huminstoffen reichste Variante (0,5 % Montmorillonitzusatz) die Kontrolle um 211 %; die Variante mit 0,25 % Montmorillonit zeigte einen Anstieg um etwa 190 % und die Variante mit 1 % Montmorillonit liegt um 155 % höher als die Kontrolle.

Für eine Bewertung des Anteiles der humifizierten Produkte am biologischen Stoffumsatz sind nicht nur die absoluten Erträge an Huminstoffen wichtig, sondern auch wie das energieliefernde Substrat zur Humifizierung ausgenutzt wurde. Um einen Eindruck über die Ausnutzung der Glukose für die Huminstoffsynthese zu bekommen, wurde daher der Glukoseverbrauch mit den gebildeten Huminstoffen ins Verhältnis gesetzt.

Hierzu ist in Tab. 15 die Menge der Pilzhuminsäuren ($HS_1 + HS_2 + HS_3$) pro 1 g verbrauchter Glukose angegeben.

Tab. 15: Menge der durch E. nigrum in Anwesenheit von Montmorillonit gebildeten Huminsäuren in Relation zum Glukose-Verbrauch
(mg C von $HS_{insg.}$ / 1 g verbrauchter Glukose)

Zusatz von Montmorill.	Schüttelkultur		Standkultur	
	20. Tag	30. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontrolle	9,30	6,63	0	6,39
0,25 %	12,36	6,92	19,31	16,54
0,50 %	21,57	2,82	22,13	18,32
1,00 %	16,06	4,49	16,91	15,54

Sollte nach den in Tab. 15 gezeigten Werten die sogenannte "Produktivität der Humifizierung" (NOVÁK, 1963) beurteilt werden, so kann man fast allgemein sagen, daß diese in den mit Montmorillonit versetzten Varianten höher ist. Für eine bessere Übersicht kann man die Werte der Tab. 15 von der Periode der höchsten Anhäufung der Huminsäuren, d.h. vom 30. Tage bei den Kontroll-Varianten, bzw. vom 20. Tage bei allen Montmorillonit-Varianten ins Verhältnis setzen. Dies gibt für die Schüttelkulturen die folgenden Werte:

Kontr.: 0,25 : 0,5 : 1 % Montm. = 1 : 1,9 : 3,3 : 2,4.

Das dementsprechende Verhältnis für die Standkultur ist:

1 : 3,0 : 3,5 : 2,6.

Allgemein kann man daher sagen, daß die Umwandlung der Glukose in die Pilzhuminsäuren bei Schüttelkulturen durch die Zugabe von Montmorillonit durchschnittlich um etwa 150 %, unter den Bedingungen der Standkultur sogar um 200 % höher liegt. Die durch eine Spaltung der Glukose freigesetzte Energie wird in den mit Montmorillonit versetzten Varianten besser für die Humifizierungsprozesse ausgenutzt.

Die höchste "Produktivität" der Humifizierung ist in beiden Fällen bei der Variante mit 0,5 % Montmorillonit (230 % bzw. 250 %) zu verzeichnen.

Da die Huminsäuren in diesem Fall ein Produkt der Pilze darstellen, war es weiterhin interessant, die Menge an Huminsäuren mit der Biomasse ins Verhältnis zu setzen. Die Werte aus einer solchen Berechnung sind in Tab. 16 zu sehen. Unter $HS_{\text{insg.}}$ wird auch dieses Mal die Summe aller drei Huminsäurefraktionen verstanden.

Tab. 16: Menge der durch E. nigrum in Anwesenheit von Montmorillonit gebildeten Huminsäure in Relation zur Menge der gebildeten Biomasse (mg C von $HS_{\text{insg.}}$ / 1 g Biomasse)

Zusatz von Montmorill.	Schüttelkultur		Standkultur	
	20. Tag	30. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontrolle	35,20	28,82	0	17,71
0,25 %	53,53	26,25	76,54	92,54
0,50 %	62,54	11,44	68,75	71,98
1,00 %	47,12	20,47	64,54	83,28

Auch aus den in Tab. 16 zusammengestellten Werten geht hervor, daß die Huminsäurebildung in den Montmorillonit-Varianten unter besseren Bedingungen erfolgt. Während in den Schüttelkulturen die Menge von Huminsäuren pro Gramm gebildeter Biomasse bei Montmorillonitzusatz zum Zeitpunkt der maximalen Huminsäure-Anhäufung etwa doppelt so hoch ist, liegen die entsprechenden Werte in den Standkulturen mehr als dreimal so hoch. Die am 30. Tage geänderten Verhältnisse bei den Schüttelkulturen sind auf den Rückgang der HS_2 und HS_3 -Fraktionen zurückzuführen, während bei den Standkulturen dann vermehrt die HS_1 -Fraktion auftritt.

Die Beeinflussung der Huminstoffbildung bei E. nigrum durch Kaolinit bzw. Quarzsand ist der Tab. 17 zu entnehmen.

Tab. 17: Bilanz der durch E. nigrum in Anwesenheit von Kaolinit und Quarzsand gebildeten Huminstoffe. (Mengenangabe in mg C/1 l)

Zusatz von Mineral	Humin- stoffe (HSt)	Kaolinit		Quarzsand	
		20. Tag	30. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontr.	HS ₁	0	44,07		
	HS ₂	0	55,63		
	HS ₃	362,83	87,91		
	FS ₂	735,00	841,20		
	FS ₃	0	0		
	HS _{insg.}	367,86	187,61		
	FS _{insg.}	735,00	841,20	siehe Kaol.	
	HSt _{insg.}	1097,86	1028,81		
	HS ₂ :HS _{insg.}	0	0,23		
	(HS ₂ +HS ₃):				
	:(FS ₂ +FS ₃)	0,49	0,17		
	HS _{insg.} :				
	:FS _{insg.}	0,49	0,22		
0,25 %	HS ₁	57,10	216,87	137,13	329,33
	HS ₂	383,83	309,33	591,80	204,40
	HS ₃	444,93	213,93	441,30	247,90
	FS ₂	760,73	479,73	601,30	363,07
	FS ₃	0	0	0	0
	HS _{insg.}	885,86	740,14	1170,23	781,63
	FS _{insg.}	760,73	479,73	601,30	363,07
	HSt _{insg.}	1646,59	1219,86	1771,53	1144,70
	HS ₁ :HS _{insg.}	0,64	0,30	0,12	0,42
	(HS ₂ +HS ₃):				
	:(FS ₂ +FS ₃)	1,09	1,09	1,72	1,25
	HS _{insg.} :				
	:FS _{insg.}	1,16	1,54	1,94	2,15

Fortsetzung Tab. 17

Zusatz von Mineral	Humin- stoffe (HSt)	Kaolinit		Quarzsand	
		20. Tag	30. Tag	20. Tag	30. Tag
0,50 %	HS ₁	76,90	294,00	92,07	306,37
	HS ₂	566,67	213,00	578,70	203,87
	HS ₃	409,63	216,37	381,13	267,70
	FS ₂	712,17	368,83	681,03	353,17
	FS ₃	0	0	0	0
	HS _{insg.}	1053,20	723,37	1051,90	777,94
	FS _{insg.}	712,17	368,83	681,03	353,17
	HSt _{insg.}	1765,37	1092,20	1732,93	1131,11
	HS ₁ :HS _{insg.}	0,07	0,41	0,09	0,40
	(HS ₂ +HS ₃):				
	:(FS ₂ +FS ₃)	1,37	1,16	1,41	1,34
	HS _{insg.} : :FS _{insg.}	1,15	1,96	1,54	2,20
1,00 %	HS ₁	48,30	146,53	217,73	169,30
	HS ₂	439,17	218,03	345,43	222,83
	HS ₃	153,80	197,93	278,80	115,33
	FS ₂	681,63	419,07	510,37	495,03
	FS ₃	0	0	0	0
	HS _{insg.}	695,27	562,49	841,96	507,46
	FS _{insg.}	681,63	419,07	510,37	495,03
	HSt _{insg.}	1376,90	981,56	1352,33	1002,49
	HS ₁ :HS _{insg.}	0,07	0,26	0,26	0,33
	(HS ₂ +HS ₃):				
	:(FS ₂ +FS ₃)	0,87	0,99	1,22	0,68
	HS _{insg.} : :FS _{insg.}	1,02	1,34	1,65	1,03

Die in den einzelnen mit Kaolinit versetzten Versuchsvarianten gebildeten Huminsäuren ($HS_{\text{insg.}}$) stehen am 20. Tage im Verhältnis von:

Kontr.: 0,25 : 0,5 : 1 % Kaol. = 1 : 2,4 : 2,9 : 1,9.

Dies deutet darauf hin, daß Kaolinit zwar nicht so stark wie Montmorillonit die Huminsäurebildung beeinflusst, jedoch noch deutlich gegenüber der Kontroll-Varianten erhöht. Ähnlich wie bei den Versuchen mit dem Montmorillonit treten zuerst die im Mycel gebildeten Huminstoffe auf. Berechnet man das Verhältnis aus HS_1 : $HS_{\text{insg.}}$ in Prozent, so ist dieses bei den Kontrollen am 20. Tage gleich Null und beträgt bei den mit Kaolinit versetzten Proben etwa 8 %. Am 30. Tage stieg der Anteil an; dies war wahrscheinlich durch die in die Lösung freigesetzte HS_1 -Fraktion bedingt. Ihr Anteil betrug bei der Kontrolle 31 %, bei der Variante mit 0,25 % Kaolinit 41 %, bei der Variante mit 0,5 % Kaolinit 68 % bzw. 35 % bei der Variante mit 1 % Kaolinitzusatz. Das in der Tab. 17 angeführte Verhältnis aus $HS_{\text{insg.}}$: $FS_{\text{insg.}}$ spricht eindeutig zugunsten der Varianten mit Tonzusatz. Eine Berechnung des Verhältnisses aus der insgesamt gebildeten Huminsäure pro Gramm Mycelmasse deutet auch bei Kaolinit- oder Quarzsandzusatz auf eine Förderung der Huminsäurebildung hin. Eine quantitative Förderung der gesamten Huminsäurefraktion ist schon der Tabelle 17 zu entnehmen und kann als ein indirekter Beweis dafür dienen, daß die Sorptionskapazität der Minerale wahrscheinlich nicht der Hauptgrund ihrer Wirksamkeit sein muß.

Unter verschiedenen Pilzen, die zur Bildung der huminstoffähnlichen Substanzen fähig sind, untersuchen MARTIN und HAIDER (1969) auch S. chartarum, der sich nach den Autoren besonders durch die Fähigkeit zur Bildung der "Mycel-Huminsäuren" auszeichnet. Eine Übersicht über die bei den hier mit diesem Pilz durchgeführten Versuche gewonnenen Huminstoffe ist in der Tabelle 18 angegeben. S. chartarum wurde dabei mit einer Zugabe von Montmorillonit (0,25 %, 0,5 % und 1 %), wie auch Kaolinit (0,5 %) und Quarzsand (0,5 %) gezüchtet.

Tab. 18: Bilanz der durch S. chartarum in Anwesenheit von Montmorillonit, Kaolinit und Quarzsand gebildeten Huminstoffe (Mengenangabe in mgC/1 l)

Zusatz von Mineral	Huminstoffe (HSt)	10. Tag	20. Tag	30. Tag
Kontr.	HS ₁	0	186,17	151,83
	HS ₂	317,49	1590,90	1497,30
	HS ₃	348,27	686,87	566,67
	FS ₂	44,03	73,17	48,20
	FS ₃	66,07	172,50	205,47
	HS _{insg.}	665,76	2563,94	2215,80
	FS _{insg.}	110,10	245,67	614,87
	HSt _{insg.}	775,86	2809,61	2830,67
	HS ₁ :HS _{insg.}	0	0,07	0,07
	(HS ₂ +HS ₃):			
	: (FS ₂ +FS ₃)	6,05	9,27	3,36
0,25 % M*	HS _{insg.} :			
	:FS _{insg.}	6,05	10,43	3,60
	HS ₁	0	86,03	180,87
	HS ₂	211,80	951,60	1441,00
	HS ₃	123,30	405,10	559,50
	FS ₂	39,00	89,27	71,03
	FS ₃	63,93	168,77	218,10
	HS _{insg.}	235,10	1442,73	2181,37
	FS _{insg.}	102,93	258,04	289,13
	HSt _{insg.}	338,03	2700,77	2470,50
	HS ₁ :HS _{insg.}	0	0,06	0,08
	(HS ₂ +HS ₃):			
	: (FS ₂ +FS ₃)	3,26	5,26	6,92
	HS _{insg.} :			
	:FS _{insg.}	3,26	5,59	7,54

M* = Montmorillonit

Fortsetzung Tab. 18

Zusatz von Mineral	Huminstoffe (HSt)	10. Tag	20. Tag	30. Tag
0,50 % M*	HS ₁	0	208,27	337,67
	HS ₂	171,56	1371,50	1777,80
	HS ₃	105,60	221,13	375,90
	FS ₂	46,27	89,20	75,30
	FS ₃	47,03	240,07	248,07
	HS _{insg.}	277,16	1800,90	2491,37
	FS _{insg.}	93,30	329,27	323,37
	HSt _{insg.}	370,46	2120,17	2814,74
	HS ₁ :HS _{insg.}	0	0,12	0,14
	(HS ₂ +HS ₃):			
	:(FS ₂ +FS ₃)	2,97	6,63	6,66
	HS _{insg.} :			
	:FS _{insg.}	2,97	5,47	7,70
1,0 % M*	HS ₁	53,50	234,30	263,07
	HS ₂	268,20	2401,80	2472,79
	HS ₃	97,17	0	0
	FS ₂	73,50	150,60	84,10
	FS ₃	78,33	194,40	114,03
	HS _{insg.}	418,87	2636,10	3735,86
	FS _{insg.}	151,83	345,00	198,13
	HSt _{insg.}	570,70	2981,10	3933,99
	HS ₁ :HS _{insg.}	0,13	0,09	0,07
	(HS ₂ +HS ₃):			
	:(FS ₂ +FS ₃)	2,41	6,96	12,48
	HS _{insg.} :			
	:FS _{insg.}	2,76	7,64	18,35

M* = Montmorillonit

Fortsetzung Tab. 18

Zusatz von Mineral	Huminstoffe (HSt)	10. Tag	20. Tag	30. Tag
0,5 % K*	HS ₁	0	382,57	343,97
	HS ₂	387,80	1665,00	1579,90
	HS ₃	155,40	610,60	372,77
	FS ₂	73,00	87,10	70,03
	FS ₃	56,03	218,97	249,53
	HS _{insg.}	543,20	2658,17	2296,64
	FS _{insg.}	129,03	306,07	319,56
	HSt _{insg.}	672,23	2964,24	2616,20
	HS ₁ :HS _{insg.}	0	0,17	0,15
	(HS ₂ +HS ₃):			
	:(FS ₂ +FS ₃)	4,21	7,43	6,11
	HS _{insg.} :			
	:FS _{insg.}	4,21	8,68	7,19
0,5 % Qu*	HS ₁	0	347,53	350,97
	HS ₂	376,60	1524,80	1650,50
	HS ₃	163,20	864,60	438,63
	FS ₂	43,80	80,00	66,23
	FS ₃	40,63	186,80	156,77
	HS _{insg.}	539,80	2736,93	2440,10
	FS _{insg.}	84,43	266,80	223,00
	HSt _{insg.}	624,23	3003,73	2663,10
	HS ₁ :HS _{insg.}	0	0,13	0,14
	(HS ₂ +HS ₃):			
	:(FS ₂ +FS ₃)	6,39	8,96	9,37
	HS _{insg.} :			
	:FS _{insg.}	6,39	10,26	10,94

K* = Kaolinit, Qu* = Quarzsand

Im Vergleich zu E. nigrum liegen die durch S. chartarum gewonnenen Erträge an Huminsäuren bzw. Huminstoffen wesentlich höher. Die Bildung setzt auch früher an. So kommt bereits am 10. Tage eine beträchtliche Menge an Huminsubstanzen in allen Versuchsvarianten vor. Als wichtigste Feststellung tritt dabei auf, daß auch diesmal die Huminsäuren zunächst im Mycel und nicht in der Lösung zu finden sind.

Bei einem Vergleich der Quotienten aus HS_2 zu HS_3 in den einzelnen Versuchsvarianten (0,9 in der Kontrolle, 1,7 in der Variante mit 0,25 % Montmorillonit, 1,6 in der Variante mit 0,5 % Montmorillonit, 2,8 in der Variante mit 1 % Montmorillonit, 2,5 in der Variante mit 0,5 % Kaolinit und 2,3 in der Variante mit 0,5 % Quarzsand) sieht man, daß mit steigender Montmorillonitzugabe, wie auch bei Zugabe der beiden anderen Minerale sich das Gleichgewicht zugunsten der HS_2 -Fraktion verschiebt. Die Mycelhuminsäuren lassen sich also immer leichter vom Mycel extrahieren und erscheinen in der Variante mit dem höchsten Montmorillonitzusatz bereits am 10. Tage in der Lösung. Dieselbe Erscheinung tritt in den mit dem Kaolinit und Quarzsand versetzten Varianten auf, nur etwas verzögert. Am 30. Tage der Kultivation beteiligt sich die HS_1 -Fraktion an der gesamten Menge von Huminsäuren bei der Kontrolle mit 7 %, bei den übrigen Versuchsvarianten im Durchschnitt mit 16 %. Bemerkenswert sind die hohen Erträge an Mycelhuminsäuren und die relativ niedrigen Gehalte an Fulvosäuren in allen Versuchsvarianten. Die in Tab. 18 angeführten Werte für die Verhältnisse aus $(HS_2 + HS_3) : (FS_2 + FS_3)$ bzw. $HS_{\text{insg.}} : FS_{\text{insg.}}$ sprechen dafür, daß in allen Varianten die Huminsäuren eine führende Rolle in der Zusammensetzung der Huminstoffe übernehmen.

Die Werte für die "Produktivität der Humifizierungsprozesse" bei S. chartarum, welche am Ende der Kultivierung ermittelt wurden, sind in der Tab. 19 angegeben.

Tab. 19: Menge der am 30. Tage der Kultivierung in Standkulturen mit S. chartarum gefundenen Huminsäuren in Relation zur verbrauchten Glukose bzw. zu gebildeter Mycel-Menge.

Mineralzusatz	mg C von HS _{insg.} pro 1 g verbr. Glukose	pro 1 g Mycelium
Kontrolle	74,78	253,52
0,25 % Montm.	85,66	279,50
0,50 % Montm.	83,97	274,07
1,00 % Montm.	126,51	446,87
0,50 % Kaolin.	77,77	220,20
0,50 % Quarz	82,16	272,63

Wie Tab. 19 zeigt, unterscheiden sich die einzelnen Werte voneinander nicht so stark, wie im Falle der E. nigrum-Kulturen. Nur durch Zusatz von 1 % Montmorillonit wurde die Produktivität der Huminsäurebildung in Bezug auf die verbrauchte Glukose bzw. die Mycel-Menge um etwa 70 % erhöht. Alle übrigen Mineral-Zusätze verursachten eine durchschnittliche Erhöhung um 10 %.

3.4 Charakterisierung der gebildeten Huminstoffe

3.41 Chemische Untersuchungen

Sofern es mengenmäßig möglich war, wurden die Huminsäure-Präparate auf den Gehalt an Kohlenstoff und Stickstoff, sowie an Asche und Kationen-Austauschkapazität bzw. auf den Gehalt von Hydroxyl- und Carboxylgruppen untersucht.

Der durch die Verbrennung des organischen Anteils bei 500°C bestimmte Aschegehalt der Lösungs- (HS₁) und Mycel-Huminsäuren (HS₂ + HS₃) von E. nigrum und S. chartarum ist in

Tab. 20 angegeben. Auf den ersten Blick sind zwei wesentliche Unterschiede in dieser Tabelle zu ersehen: Unterschiede, die auf der Herkunft beruhen und Unterschiede, die im Zusammenhang mit der Beimischung von einzelnen Mineralien stehen. Die von E. nigrum gebildeten Huminsäuren enthielten einen besonders hohen Asche-Anteil. Dieses gilt vor allem für die Lösungshuminsäure, welche aus den mit Montmorillonit versetzten Versuchsvarianten gewonnen wurden.

Tab. 20: Aschegehalt der durch E. nigrum bzw. S. chartarum in Anwesenheit von Montmorillonit, Kaolinit und Quarzsand gebildeten Huminsäuren
(Angaben in Prozent)

Mineral- zusatz	<u>E. nigrum</u>		<u>S. chartarum</u>	
	HS ₁	HS ₂ + HS ₃	HS ₁	HS ₂ + HS ₃
Kontrolle	11,86	7,46	2,04	1,13
0,25 % Montm.	17,80	-	2,72	1,49
0,50 % Montm.	37,96	-	4,00	1,65
1,00 % Montm.	63,41	-	15,34	1,69
0,25 % Kaol.	12,49	13,10	-	-
0,50 % Kaol.	14,46	15,20	2,02	2,41
1,00 % Kaol.	16,69	18,68	-	-
0,25 % Quarz	18,23	11,23	-	-
0,50 % Quarz	12,51	15,19	2,05	1,23
1,00 % Quarz	14,23	18,81	-	-

Bei der Variante mit 1 % Montmorillonit-Zusatz war der höchste Aschegehalt zu verzeichnen. Die aus der Lösung dieser Variante gewonnenen Huminsäuren enthielten über die Hälfte des Gewichts an Asche. Selbst bei den asche-armen S. chartarum-Huminsäuren wurde in der gleichen Versuchsvariante über 15 % Aschegehalt gefunden. Fast allgemein wurde ein Ascheanstieg mit steigender Konzentration der mineralischen Zusätze beobachtet. Die Mycel-Huminsäuren

von S. chartarum waren gegenüber den Lösungshuminsäuren ärmer an Mineral-Beimischungen, die von E. nigrum manchmal reicher oder gleich.

Der Gehalt an Kohlenstoff, Stickstoff und das C:N-Verhältnis von Lösungs- und Mycelhuminsäuren aus Standkulturen von E. nigrum kann aus den Angaben der Tab. 21 beurteilt werden. In der gleichen Tabelle sind außerdem die Werte für die Summe der funktionellen Gruppen (nach DRAGUNOVA, 1958) angegeben. Diese Summe entspricht der Austauschkapazität bei pH 8. Alle Werte sind auf aschefreie Substanzen berechnet.

Mit Ausnahme der Lösungshuminsäuren der Montmorillonit-Varianten ist der Gehalt an Kohlenstoff in der 1. Fraktion von Huminsäuren ziemlich gleich. Das gleiche kann man über die Summe der funktionellen Gruppen sagen. Der Anteil an Stickstoff ist allgemein sehr hoch, was sich im C:N-Verhältnis widerspiegelt. Die Mycel-Huminsäuren zeigen, außer bei der Kontroll-Variante, in Bezug auf Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte niedrigere Werte als die HS₁-Fraktionen. Meistens kommt es auch noch zur Verengung des C:N-Verhältnisses. Der Gehalt an funktionellen Gruppen ist wesentlich niedriger als der der Lösungs-Huminsäuren.

Tab. 21: Gehalte an Kohlenstoff und Stickstoff, das C:N-Verhältnis und die Summe der funktionellen Gruppen in den durch *E. nigrum* in Standkulturen mit Mineralzusätzen gebildeten Huminsäuren

	HS ₁			FG ^{*)}
	% C	% N	C:N	meq/100 g
Kontrolle	41,9	7,9	5,3	500,0
0,25 % Montm.	37,7	8,7	4,3	293,7
0,50 % Montm.	37,3	7,7	4,8	327,1
1,00 % Montm.	40,5	7,9	5,1	388,5
0,25 % Kaol.	42,5	8,3	5,1	481,4
0,50 % Kaol.	43,5	8,3	5,2	533,2
1,00 % Kaol.	46,7	7,9	5,4	552,9
0,25 % Quarz	43,1	8,4	5,1	543,9
0,50 % Quarz	42,7	8,0	5,3	528,0
1,00 % Quarz	40,7	8,8	4,6	524,8

	HS ₂ + HS ₃			FG ^{*)}
	% C	% N	C:N	meq/100 g
Kontrolle	41,8	7,2	5,8	257,2
0,25 % Montm.	-	-	-	-
0,50 % Montm.	-	-	-	-
1,00 % Montm.	-	-	-	-
0,25 % Kaol.	33,9	7,2	4,7	228,4
0,50 % Kaol.	36,1	7,3	4,9	238,5
1,00 % Kaol.	43,8	8,0	5,5	246,0
0,25 % Quarz	34,7	7,3	4,8	314,6
0,50 % Quarz	37,6	5,7	6,6	255,7
1,00 % Quarz	35,4	8,6	4,1	420,7

*) Summe funktioneller Gruppen

Ein anderes Bild bieten die von S. chartarum gebildeten Huminsäuren. Die in Tab. 22 zusammengestellten Werte be-
weisen, daß die Huminstoffbildung bei S. chartarum nicht
nur mengenmäßig (Tab. 18), sondern auch qualitativ unter-
schiedlich von der bei E. nigrum verläuft. Die Gehalte an
Kohlenstoff sind fast allgemein höher, jedoch nehmen die
Huminsäuren der Varianten mit Mineralzusatz im Kohlenstoff-
gehalt gegenüber der Kontrolle ab. Dieses gilt hauptsäch-
lich für die Lösungshuminsäuren, die Abnahme bei den Mycel-
huminsäuren ist nicht so stark.

Tab. 22: Der Gehalt an Kohlenstoff, Stickstoff, das C:N-Ver-
hältnis und die funktionellen Gruppen in den von
S. chartarum in Standkulturen mit Mineralzusatz
gebildeten Huminsäuren

Frak- tion der HS	Mineral- zusatz	% C	% N	C:N	meq COOH 100 g	meq OH 100 g	FG ^{*)} meq/ 100 g
HS ₁	Kontrolle	52,7	5,1	10,4	228,7	24,7	253,4
	0,25 % M ^{*)}	44,9	4,9	9,1	259,7	11,6	271,3
	0,50 % "	46,8	4,9	9,5	245,8	23,6	269,4
	1,00 % "	43,4	4,6	9,4	222,9	48,8	271,7
	0,50 % K ^{*)}	44,9	5,2	8,7	221,4	31,5	252,8
	0,50 % Qu ^{*)}	48,5	5,1	9,6	230,8	31,6	262,3
HS ₂ +	Kontrolle	50,8	5,7	8,9	139,6	57,8	197,3
	0,25 % M ^{*)}	49,3	5,2	9,4	154,3	112,2	266,5
	0,50 % "	47,3	5,6	8,5	138,0	154,4	292,3
	1,00 % "	48,0	6,8	7,1	161,3	86,7	248,0
HS ₃	0,50 % K ^{*)}	49,7	6,2	8,0	152,3	123,1	275,4
	0,50 % Qu ^{*)}	48,4	5,9	8,2	138,6	130,1	268,7

*) M = Montmorillonit, K = Kaolinit, Qu = Quarzsand,
FG = Summe funktioneller Gruppen

Im Gegensatz zu E. nigrum-Huminsäuren ist hier der C-Gehalt der $HS_2 + HS_3$ -Fraktionen etwas höher als der der Lösungshuminsäuren. Die Gehalte an Stickstoff in den aschefreien S. chartarum-Huminsäuren kommen fast in den für Bodenhuminsäuren üblichen Bereich. Es zeigt sich auch hier wieder, daß der Stickstoffgehalt bei den $HS_2 + HS_3$ -Fraktionen höher liegt als in der HS_1 -Fraktion. Das C:N-Verhältnis erniedrigt sich mit steigendem Montmorillonitzusatz sowohl bei den HS_1 -Fraktionen als auch bei den $HS_2 + HS_3$ -Fraktionen. Im Falle von HS_1 liegt die Ursache mehr in der Abnahme der Kohlenstoffgehalte, bei den $HS_2 + HS_3$ -Fraktionen in der Stickstoffzunahme. Alle C:N-Werte sind wesentlich höher als bei den E. nigrum-Huminsäuren. Die Lösungs- und Mycelhuminsäuren von Versuchsvarianten mit Mineralzusatz haben meistens höhere Werte im Gehalt der austauschbaren funktionellen Gruppen als die zuständigen Kontrollvarianten.

3.42 Spektrophotometrische Untersuchungen

Zur Erweiterung der Kenntnis über die Eigenschaften der in den Versuchen isolierten Pilzhuminsäuren, wurden weiterhin spektrophotometrische Untersuchungen durchgeführt.

Wie es sich gezeigt hatte, enthielten besonders die durch E. nigrum in Anwesenheit von Mineralzusätzen gebildeten Huminsäuren einen hohen Anteil an Asche. Zur Analyse der Zusammensetzung dieses mineralischen Anteils wurden die Proben von E. nigrum-Lösungshuminsäuren mit Hilfe von 30 %igem H_2O_2 in Platinschalen bis zur Entfärbung oxydiert. Der mineralische Rückstand wurde vacuumgetrocknet und anschließend spektrophotometrisch im IR-Bereich untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind der Abb. 8 zu entnehmen. Da die silikatischen Tonminerale nach FLAIG und BEUTELSPACHER (1961) außer den OH-Banden fast ausnahmslos erst von 8μ aufwärts charakteristische Banden zeigen, beschränkt sich die Wiedergabe auf diesen Bereich.

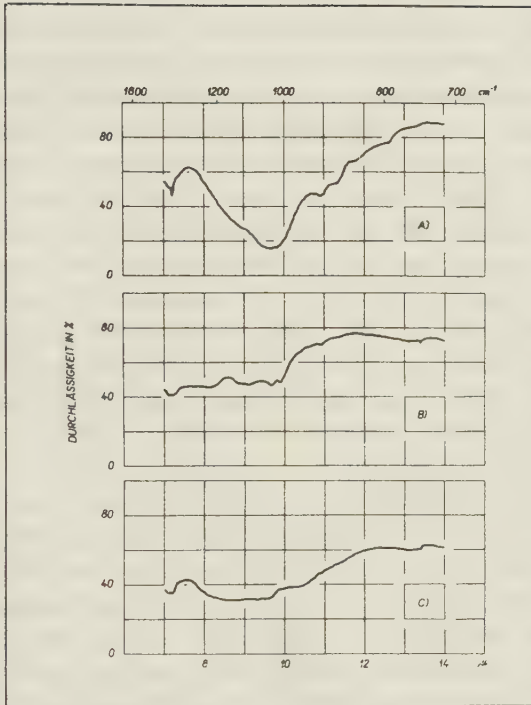


Abb. 8: Infrartospektren des mineralischen Anteils von E. nigrum-Lösungshuminsäuren (HS_1) isoliert aus den Versuchsvarianten mit Montmorillonit (A), Kaolinit (B) und Quarzsand (C)

Alle drei IR-Spektren zeigen eine gewisse Ähnlichkeit der mineralischen Anteile der HS_1 -Fraktionen von E. nigrum-Huminsäuren mit den zugesetzten Mineralen. Am deutlichsten ist dies beim Rückstand der Huminsäuren von Varianten mit Montmorillonitzusatz zu erkennen. Das entsprechende IR-Spektrum (Abb. 8A) besitzt die für Montmorillonit charakteristische Banden bei 9,7 und 9,85 μ , bei 10,92 und 11,3 μ , wie auch bei 12,55 μ . Die Intensität der Banden erlaubt die

Annahme, daß Montmorillonit den Hauptanteil des mineralischen Rückstandes darstellt. Der Gehalt der beiden anderen Minerale in der Asche der betreffenden Huminsäuren ist zwar nicht so stark ausgeprägt, jedoch immer noch deutlich. Dies zeigt das zweite IR-Spektrum (Abb. 8B) vom Rückstand der E. nigrum-Lösungshuminsäure, die in Anwesenheit von Kaolinit gebildet wurde. Trotz einer nicht allzu starken Banden-Intensität erkennt man die für Kaolinit typischen Banden bei 8,97, 9,1, 9,68, 9,91, 10,62 und 10,92 μ , wobei insbesondere die Doppelbande bei 9,68 und 9,91 μ hervortritt. Keine gute Übereinstimmung mit dem ursprünglich zugesetzten Mineral zeigt jedoch das in Abb. 8C gezeigte IR-Spektrum. Es handelt sich hier um das Spektrum des Rückstandes der Lösungshuminsäure, die durch E. nigrum bei Quarzsand-Zusatz gebildet wurde. Hier sind die für Quarzsand charakteristischen Absorptionsbanden fast nicht mehr erkennbar.

Im Gegensatz zu den Spektren der meisten höhermolekularen Stoffe zeigen die Elektronenspektren von Huminsäuren (Huminstoffe) keine Maxima, sondern eine nach kürzeren Wellen monoton ansteigende Kurve, die als Wellenlängen gegen den Logarithmus der Extinktion aufgetragen, annähernd linear verläuft (zit. nach FLAIG, 1966). Nach dem in Abschnitt 2.5 ausgeführten Verfahren wurden die Logarithmen der Extinktionen der verschiedenen Pilzhuminsäure-Fractionen erst entsprechend umgerechnet und dann gegen die Wellenlänge aufgetragen. Die dadurch erhaltenen logarithmischen Geraden ermöglichen es, die Präparate von Huminsäuren nach ihren optischen Eigenschaften (Farbton) gegeneinander zu vergleichen. Die Ergebnisse dieser spektrophotometrischen Messungen sind in den Abb. 9 und 10 für E. nigrum-Huminsäuren in Form graphischer Darstellungen gezeigt. In den Abb. 11 und 12 sind sie entsprechend für S. chartarum dargestellt. Die Farbquotienten $Q_{4/6}$ bzw. die theoretischen Farbquotienten $Q_{4/6 \text{ theor.}}$ sind für S. chartarum in der Tab. 24 wiedergegeben. Aus Abb. 9 geht hervor, daß die optische Dichte (von 425-675 nm) der Lösungshuminsäuren von E. nigrum aus den Standkulturen mit Montmorillonit in der folgenden

Reihenfolge abnimmt: 0 > 0,25 % Montm. > 0,5 % Montm. > 1 % Montm. Die entsprechenden Werte der theoretischen Farbquotienten $Q_{4/6}$ betragen bei der Kontrolle 8,1, bei der Variante mit 0,25 % Montmorillonit 12,4, bei der Variante mit 0,5 % Montmorillonit 13,5 und bei der Variante mit 1 % Montmorillonit 27,5.

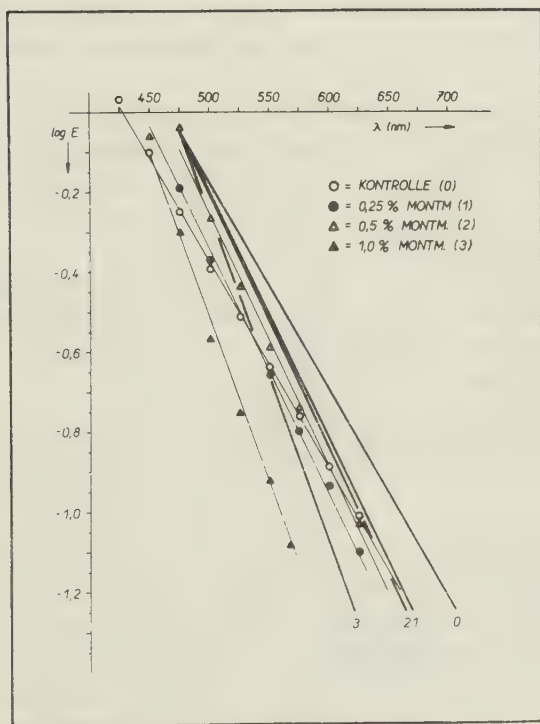


Abb. 9: Logarithmische Geraden der Extinktionen von E. nigrum-Lösungshuminsäuren (HS_1) aus den Versuchsvarianten mit Montmorillonit

Nach FREYTAG (1955, 1956), KONONOVA (1963) u.a. steht die optische Dichte im Zusammenhang mit dem Kopplungsgrad der Huminsäuren-Baueinheiten, bzw. mit der Dispersität der kolloidalen Huminsäurelösung. Je größer die optische Dichte ist, desto geringer soll der Dispersitätsgrad sein. Nach Abb. 10 und den danach berechneten Farbquotienten ist die Dispersität der Mycelhuminsäuren der Kontroll-Variante und der Variante mit 0,25 % Montmorillonit niedriger (theor. $Q_{4/6}$ 7,0 bzw. 8,4), als die der entsprechenden Lösungshuminsäuren. Die Werte der theoretischen $Q_{4/6}$ -Quotienten der Varianten mit höherem Montmorillonit-Zusatz liegen jedoch deutlich höher (24,2 für die Variante mit 1 % Montmorillonit).

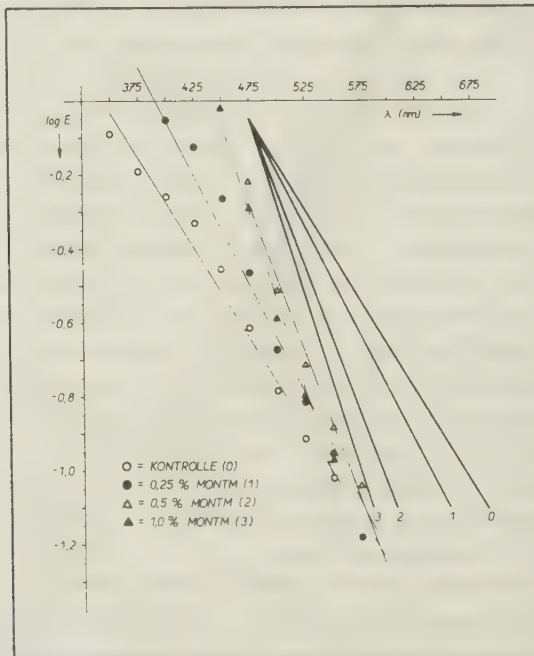


Abb. 10: Logarithmische Geraden der Extinktionen von *E. nigrum*-Mycelhuminsäuren ($HS_2 + HS_3$) aus den Versuchsvarianten mit Montmorillonit

Bei den durch E. nigrum in den Schüttelkulturen bei Montmorillonit-Zusatz gebildeten Mycelhuminsäuren wurde eine gleiche Tendenz beobachtet.

Die in Anwesenheit von Kaolinit und Quarzsand in Standkulturen durch E. nigrum gebildeten Lösungshuminsäuren zeigen ebenfalls einen höheren Dispersitätsgrad im Vergleich zu der Kontrolle. Die berechneten theoretischen $Q_{4/6}$ - Quotienten waren folgende: Kontrolle = 9,1; mit 0,25 % Kaolinit = 13,8; mit 0,5 % Kaolinit = 18,2; mit 1 % Kaolinit = 16,1; mit 0,25 % Quarzsand = 13,6; mit 0,5 % Quarzsand = 11,2; mit 1,0 % Quarzsand = 10,7.

Während alle von E. nigrum gebildeten Huminsäuren sich selbst am Ende des Versuches durch einen ziemlich hohen Dispersitätsgrad auszeichneten, zeigten die S. chartarum-Huminsäuren bereits am 10. Tage der Kultivierung eine hohe optische Dichte. Dieses ist der Tab. 23 zu entnehmen. Wie die Werte der Farbquotienten zeigen (Tab. 23), kommt es zu einer gewissen Steigerung der Dispersität der Lösungshuminsäuren vom 10. bis zum 30. Tage der Kultivierung. Die Lösungshuminsäuren der Varianten mit 0,25 % und 0,5 % Montmorillonit bleiben in ihrer Dispersität immer über der Kontrolle, der höchste Montmorillonitzusatz hatte im Gegenteil dazu, eine Erniedrigung der Dispersität zur Folge.

Der am 30. Tage erreichte Zustand ist am besten aus den Abbildungen 11 und 12 zu ersehen. Die logarithmischen Geraden zeigen, daß die S. chartarum-Lösungshuminsäuren nach ihrer optischen Dichte in folgender Reihenfolge stehen: 1 % Montmorillonit = 0,5 % Kaolinit > 0,5 % Quarzsand > Kontrolle > 0,5 % Montmorillonit > 0,25 % Montmorillonit. Ausgenommen der Variante mit einem Zusatz von 0,25 % Montmorillonit ist jedoch der Dispersitätsgrad der Lösungshuminsäuren nicht allzu unterschiedlich.

Tab. 23: Die Farbquotienten $Q_{4/6}$ und theoretischen $Q_{4/6}$ der durch *S. chartarum* in Anwesenheit von Montmorillonit, Kaolinit und Quarzsand gebildeten Huminsäuren

Tag	Mineralzusatz	HS ₁		HS ₂ + HS ₃	
		$Q_{4/6}$	theor. $Q_{4/6}$	$Q_{4/6}$	theor. $Q_{4/6}$
10.	Kontrolle	-	-	3,08	3,09
	0,25 % Montm.	-	-	-	4,57
	0,50 % Montm.	-	-	3,70	3,31
	1,00 % Montm.	2,28	2,24	3,54	3,48
	0,50 % Kaolin.	-	-	3,14	3,31
	0,50 % Quarz	-	-	3,22	3,35
20.	Kontrolle	2,49	2,84	-	2,74
	0,25 % Montm.	-	4,44	-	3,95
	0,50 % Montm.	-	4,12	-	3,09
	1,00 % Montm.	2,53	2,44	3,16	2,73
	0,50 % Kaolin.	2,57	2,33	-	2,62
	0,50 % Quarz	2,76	2,61	-	2,53
30.	Kontrolle	-	3,36	3,49	2,86
	0,25 % Montm.	-	5,00	-	4,23
	0,50 % Montm.	-	3,63	-	2,96
	1,00 % Montm.	2,55	2,75	3,53	2,98
	0,50 % Kaolin.	2,96	2,72	3,59	2,84
	0,50 % Quarz	3,10	3,21	3,35	2,71

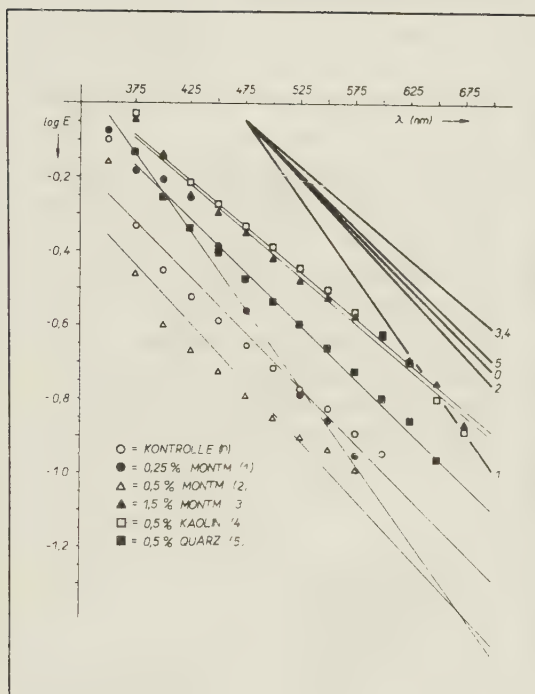


Abb. 11: Logarithmische Geraden der Extinktionen von S. chartarum-Lösungshuminsäuren (HS₁)

Alle untersuchten Präparate der Mycelhuminsäuren zeigen ebenfalls eine gewisse Abnahme der Dispersität vom 10. zum 20. Tage der Kultivierung. Am 30. Tage nimmt diese jedoch wieder zu, die Werte bleiben aber unter denen des 10. Tages. Vom Anfang bis zum Ende der Kultivierung besitzen die Mycelhuminsäuren von der Varianten mit 0,25 % Montmorillonit den höchsten Dispersitätsgrad. Im allgemeinen liegen die in Tab. 23 zusammengestellten Werte der Farbquotienten wie auch der Verlauf der logarithmi-

schen Extinktionsgeraden von S. chartarum-Huminsäuren denen der echten Bodenhuminsäuren näher und entsprechen ange-
nähert der Schwarzerdehuminsäuren (FLAIG et al. 1955,
KONONOVA, 1963, 1966a)

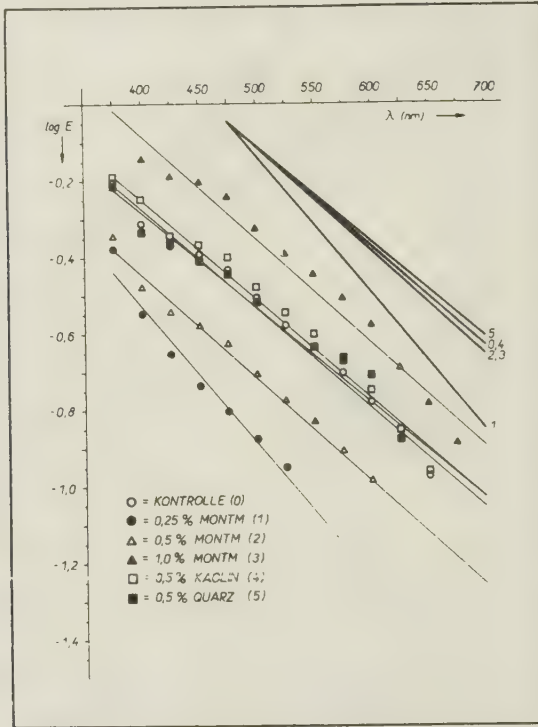


Abb. 12: Logarithmische Geraden der Extinktionen von S. chartarum-Mycelhuminsäuren

3.5 Veränderungen an Montmorillonit während des Pilzwachstums =====

und der Bildung von Huminstoffen =====

Die bisher geschilderten Ergebnisse zeigen eine Beeinflussung des Pilzwachstums und der Huminstoffbildung durch Tonminerale und Quarzsand. Nach der Theorie des bio-organo-

mineralischen Komplexe (LAZAREW, 1949) stehen die einzelnen aktiven Bestandteile dieses Komplexes in einer Wechselwirkung, die sich möglicherweise durch eine Änderung von den zugesetzten Mineralen bemerkbar macht. Um dies zu überprüfen, wurden die einer unbeimpften Nährlösung zugesetzten und anschließend abzentrifugierten Minerale nach dem Trocknen mit Hilfe der Röntgenbeugung untersucht. Ähnliche Untersuchungen wurden mit den Mineralen während der Kultivierung der Pilze durchgeführt. Wie zu erwarten war, treten beim Kaolinit und Quarz keine Änderung der Beugungsreflexe auf, während Montmorillonit ein unterschiedliches Verhalten zeigte. Dieses ist den folgenden Abbildungen zu entnehmen. So zeigt die Abb. 13 Verschiebung des Basisreflexes von Montmorillonit im Kontakt mit der unbeimpften Nährlösung.

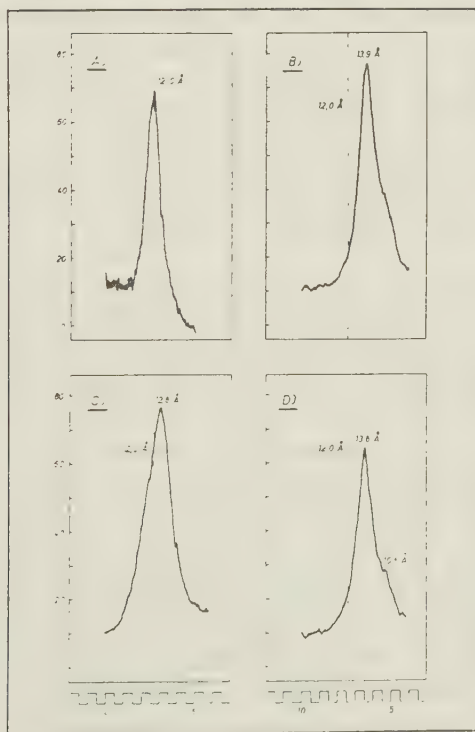


Abb. 13: Röntgenbeugungsspektren von Montmorillonit vor und nach dem Kontakt mit der Nährlösung. [A) vor dem Kontakt; B) nach dem Kontakt mit einer kompletten Nährlösung; C) nach dem Kontakt mit einer Nährlösung ohne Glukose; D) nach dem Kontakt mit einer Nährlösung ohne Asparagin]

Der verwendete Montmorillonit (Abb. 13A) zeigte einen starken Basisreflex bei $12 \text{ \AA}$. Nach der Sterilisation mit einer kompletten Nährlösung und anschließendem 24-stündigen Schütteln zeigte er (Abb. 13B) eine Verschiebung der Lage des Basisreflexes und eine Aufweitung der Zwischenschichten. Um festzustellen, welche der beiden Hauptbestandteile diese Veränderungen verursachen, wurde das gleiche Verfahren, jedoch ohne Glukose bzw. ohne Asparagin in der Nährlösung, wiederholt.

Wurde die Nährlösung ohne Glukose angesetzt, dann verschob sich der Basisreflex des Montmorillonits nur noch auf etwa $12,8 \text{ \AA}$ (Abb. 13C). Der Montmorillonit aus einer Nährlösung ohne Asparagin aber mit Glukose zeigt die gleiche Verschiebung des Basisreflexes, wie die komplette Nährlösung. Zusätzlich ist noch eine gewisse Intensitätsabnahme zu erkennen, die auf eine Einlagerung der organischen Substanz zwischen die Schichtpakete hinweist (Abb. 13D). Ausgeprägtere Veränderungen des zugesetzten Montmorillonits treten jedoch erst während des Pilzwachstums auf. Eine Übersicht darüber ist in der Abbildung 14 gegeben.

Bereits nach dreitägiger Kultivierung ist eine starke Änderung der Röntgenbeugungsspektren zu beobachten. Die Lage des Basisreflexes ändert sich ähnlich wie in Anwesenheit der reinen Nährlösung, es kommt jedoch nicht nur zur Verbreitung des Reflexes auf etwa $14 \text{ \AA}$, sondern auch zu weiteren Beugungsreflexen im Bereich zwischen 14 und $18 \text{ \AA}$. Eine solche Reflexänderung läßt sich nur durch den Einbau von niedermolekularen Produkten in die Zwischenschicht-räume erklären. Am 5. und 7. Tag bleibt die Lage des Basisreflexes unverändert, jedoch seine Intensität wird schwächer. Die Aufweitung der Schichtpakete durch die eingebauten organischen Stoffe wird immer ausgeprägter. Am 9. Tag erscheint dann durch den Einbau der organischen Substanz verschiedener Teilchengröße und Bindungskräfte zwischen die Schichtpakete eine Verformung der Gauß-Kurve.

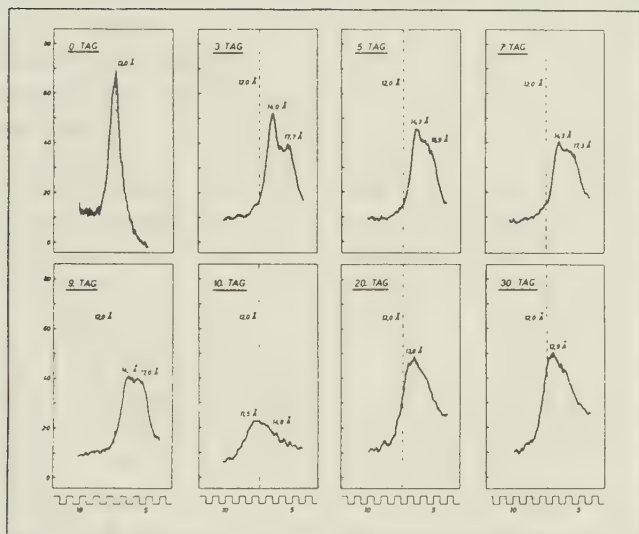


Abb. 14: Veränderung der Röntgenbeugungsspektren von Montmorillonit im Laufe der 30-tägigen Kultivierung von E. nigrum in Schüttelkulturen

Der Basisreflex zeigt sich als breites Band, das sich auf einen Bereich von 14 bis 17 Å erstreckt. Am 10. Tag der Kultivierung ist diese Verformung noch deutlicher, jedoch setzt der Austausch der organischen Substanz ein und es findet eine Teilkontraktion zwischen den Schichtabständen statt. Der Basisreflex liegt zwischen 11,5 - 15 Å. Durch die Ammoniak-Ausscheidung zwischen dem 20. und 30. Tage findet eine Reaktionsänderung im Kulturmedium statt. Die zwischen den Schichtpaketen des Montmorillonits adsorbierte organische Substanz wird durch die NH_4 -Ionen ausgetauscht. Infolgedessen verschob sich am 20. Tag der Basisreflex auf 13,8 Å und am 30. Tag betrug der Schichtabstand nur noch 12,9 Å.

Ein ähnlicher, jedoch zeitlich verzögerter Verlauf der Zwischenschichtänderungen des zugesetzten Montmorillonits wurde auch bei den Standkulturen von E. nigrum beobachtet (Abb. 15).

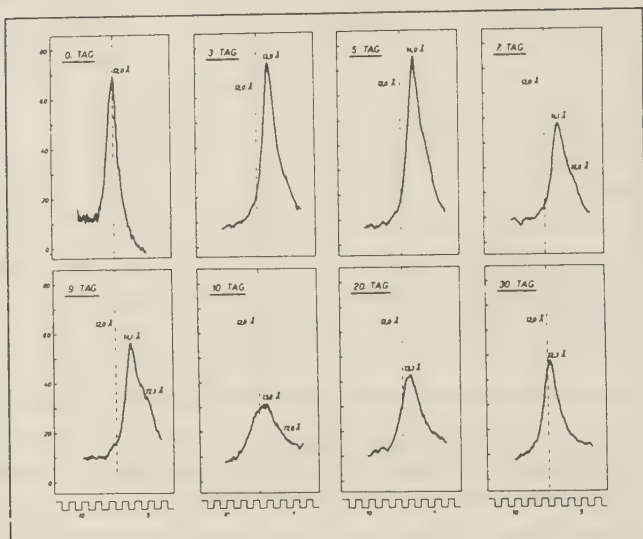


Abb. 15: Veränderung der Röntgenbeugungsspektren von Montmorillonit im Laufe der 30-tägigen Kultivierung von E. nigrum in Standkulturen

Am 3. und 5. Tage der Kultivierung kam es nur zu einer Verschiebung der Lage des Reflexes von 12 bis 14 Å und zu einer gewissen Verbreiterung der Basisfläche. Seine Intensität blieb jedoch unverändert. Am 7. Tage tritt deutlich eine Intensitätsabnahme des Basisreflexes hervor und am 9. Tage erscheinen noch zusätzliche Beugungsreflexe zwischen 16 und 18 Å, die wieder auf einen Einbau von niedermolekularen Produkten zwischen die Schichtpakete zurückzuführen sind. Am 10. Tage werden ähnlich, wie bei den Schüttel-

kulturen die Zwischenschichten in einem ungeordneten Zustand gebracht, wie dies aus dem Bandspektrum zwischen ca. 11,8 bis 18 Å ersichtlich ist. Im Laufe der weiteren Kultivierung werden die Zwischenschichten durch den NH_4^+ -Eintausch wieder geordnet; dies zeigte sich in einer Intensitätsverstärkung des Basisreflexes. Es kommt zu einer deutlichen Kontraktion der Zwischenschicht-Abstände.

Die Abbildung 16 zeigt, daß auch bei Versuchen mit Montmorillonit in Dialysierschläuchen bei beimpften Nährlösungen eine ähnliche Erscheinung zu Beobachten war.

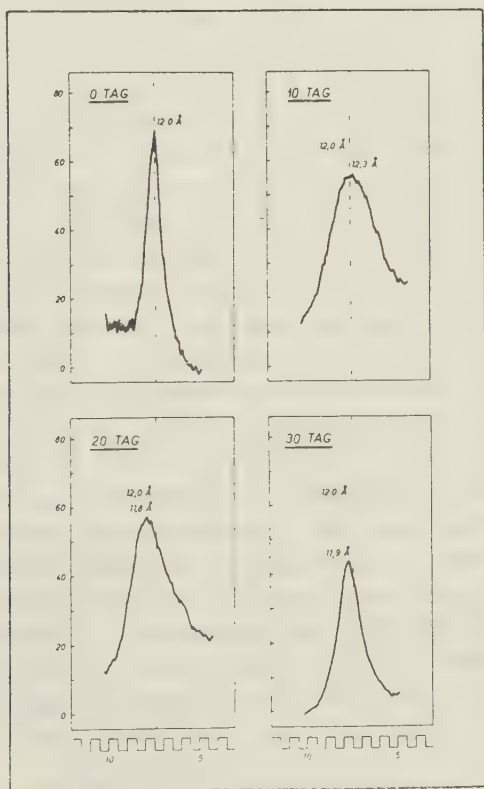


Abb. 16: Veränderung der Röntgenbeugungsspektren von Montmorillonit aus Dialysierschläuchen im Laufe der 30-tägigen Kultivierung von E. nigrum in Schüttelkulturen

3.6 Sorptionerscheinungen von Huminsäurevorstufen an Mont-

morillonit

Die im vorherigen Abschnitt 3.5 geschilderten Ergebnisse beweisen, daß es im Laufe der ersten 10 Tage der Pilzkultivierung zu einer Änderung des Montmorillonits kommt, welche wahrscheinlich durch einen Einbau niedermolekularer Pilzstoffwechselprodukte verursacht sein könnte. Da MARTIN et al. (1967), HAIDER und MARTIN (1967, 1970), wie auch MARTIN und HAIDER (1969) mehrere phenolische Verbindungen in den Kulturmedien und im Mycel von huminsäurebildenden Pilzen gefunden und identifiziert haben, wurde bei den hier berichteten Versuchen überprüft, ob die Veränderungen der Röntgenbeugungsspektren durch den sorptiven Einbau dieser Verbindungen erklärbar sein könnte. Es hat sich gezeigt, daß die Änderungen der Röntgenbeugungsspektren in den Pilzkulturen ausschließlich während der ersten 10 Tage und der sauren Phase des Kultivationsmediums eintraten (siehe Tab. 13); daher wurden die Sorptionerscheinungen in diesem pH-Bereich durchgeführt. Wie Orientierungsversuche mit Orcin zeigten, fand auch bei höherem pH-Wert (pH 7, bzw. 8) keine nennenswerte Sorption statt. Es wurden insgesamt 14 phenolische Verbindungen in die Versuche einbezogen.

0,1 mMol des jeweiligen Phenols befanden sich in 20 ml sterilem Phosphatpuffer, dem 1 % Montmorillonit zugegeben war. Diese Suspension wurde danach 24 Stunden geschüttelt und das Mineral anschließend bei 14 000 g abzentrifugiert. Die Überstände wurden in 1 cm Schichtdicke im UV-Bereich bei passender Verdünnung mit einem registrierenden Spektrophotometer gemessen (Typ DU der Fa. Beckman, München) und mit den Standardpräparaten verglichen. Die Ergebnisse des Versuches sind in der Tab. 25 zusammengestellt.

Tab. 25: Sorption der phenolischen Verbindungen durch Montmorillonit bei pH 4-6 (Angaben in % der ursprünglichen Phenolkonzentration)

Phenolische Verbindung	Sorption in Prozenten		
	pH 4	pH 5	pH 6
Resorcin	0	0	0
Orcin	15,4	9,7	9,7
Resorcylocarbonsäure	13,2	8,1	8,1
2,3,4-Trihydroxybenzoesäure	42,7	46,3	0
Gallussäure	15,0	15,0	15,0
p-Hydroxymitsäure	0	0	0
Kaffeesäure	0	0	0
Ferulasäure	16,0	0	0
p-Hydroxybenzoesäure	6,0	6,0	6,0
Protocatechusäure	21,0	21,0	21,0
Vanillinsäure	4,0	0	0
2,3,5-Trihydroxytoluol	-	-	-
2,4,5-Trihydroxytoluol	-	-	-
5-Methylpyrogallol	-	-	-

Die Ergebnisse der spektrophotometrischen Untersuchungen zeigten, daß fast bei allen überprüften Phenolcarbonsäuren mit einer Sorption durch Montmorillonit zu rechnen ist. Diese Sorption ist geringer bei den Phenolen ohne Carboxylgruppe. Das Maximum der Sorption liegt meist im sauren Bereich und nimmt zum neutralen hin ab. Bei 2,3,5- und 2,4,5-Trihydroxytoluol und bei 5-Methylpyrogallol kam es durch Oxydation zur Änderung der Extinktionsmaxima. Deswegen konnte die Sorption nicht einwandfrei beurteilt werden.

3.7 Sauerstoffaufnahme von phenolischen Verbindungen in An-

wesenheit von Montmorillonit

Zum Mechanismus der Huminstoffbildung durch E. nigrum und andere Pilze haben HAIDER und MARTIN (1967, 1970) bzw. MARTIN und HAIDER (1969) festgestellt, daß die durch die Pilze gebildeten Phenole nach der Einführung weiterer Hydroxylgruppen in autoxydierbare Verbindungen überführt wurden. Unter anderem waren dies 2,3,5-Trihydroxy-, 2,4,5-Trihydroxytoluol oder auch 2,3,4-Trihydroxybenzoesäure. In Modellversuchen konnten die Autoren mit Hilfe von manometrischen Methoden zeigen, daß die Phenole nach der Oxydation durch Luftsauerstoff mit den anderen Phenolen im neutralen oder schwach alkalischen pH-Bereich reagieren und zu polymeren Produkten zusammentreten. Aminosäurederivate werden in diese Reaktionen mit einbezogen. Eine Reaktion der autoxydablen Phenole mit den in diesem pH-Bereich nicht autoxydablen Phenolen machte sich in einer Erhöhung der O_2 -Aufnahme bemerkbar, ebenso die Reaktion der Aminosäuren. Spuren von Fe^{++} oder Cu^{++} -Ionen beschleunigen die Oxydation.

Die in 3.6 geschilderten Ergebnisse zeigen, daß besonders im sauren pH-Bereich eine meßbare Sorption von Phenolen an Montmorillonit stattfindet. Durch diese Sorption könnte die Oxydierbarkeit der Phenole geändert werden. Es wäre auch vorstellbar, daß die in den Tonmineralen vorhandenen Schwermetalle als zusätzliche Oxydationskatalysatoren wirken. Aus diesem Grunde wurden einige manometrische Versuche mit Phenolgemischen, wie sie von den oben zitierten Autoren verwendet wurden in Gegenwart von Montmorillonit durchgeführt.

In den Hauptraum von Warburg-Gefäßen wurden $20 \mu\text{Mol}$ eines der in Tab. 26 aufgeführten Phenole, das in Phosphatpuffer pH 7 oder 8 gelöst war, eingefüllt. In den Seitenarm kamen

5 μ Mol von 2,3,5-Trihydroxy- oder 2,4,5-Trihydroxytoluol oder von 2,3,4-Trihydroxybenzoesäure oder Pyrogallol in 0,5 ml Wasser gelöst. Der Kontrollvariante wurde kein Montmorillonit zugesetzt, die anderen Varianten enthielten 0,5 % Montmorillonit. Im Zentralgefäß befanden sich 0,2 ml 10 %ige NaOH. Nach Temperatureinstellung (28°C) wurde der Inhalt des Seitenarms in den Hauptraum gekippt und die Sauerstoffaufnahme über 3-4 Stunden gemessen. Bei einigen Versuchen waren den Lösungen im Hauptraum 10 ppm Fe^{++} zugesetzt. In Tab. 26 sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt.

Tab. 26: O_2 -Aufnahme (in μ Mol O_2) von phenolischen Verbindungen in Gegenwart von Montmorillonit bei pH 7 und 8

	pH 7		pH 8	
	O	M	O	M
5 μ Mol 5-MPG*)	5,6	5,5	6,1	6,2
+ 20 μ Mol PCS	6,0	5,8	6,4	6,2
+ 20 μ Mol KS	6,5	6,5	9,3	9,2
+ 20 μ Mol Orc.	6,0	5,8	6,3	6,5
5 μ Mol 2,3,4-THBS	3,3	2,3	6,0	6,4
+ 20 μ Mol PCS	3,5	3,6	6,9	7,0
+ 20 μ Mol KS	5,0	5,6	13,0	11,3
+ 20 μ Mol Orc.	3,6	3,5	11,5	11,4
5 μ Mol 2,3,5-THT	5,5	5,6	5,9	6,4
+ 20 μ Mol PCS	6,4	6,8	8,0	7,5
+ 20 μ Mol KS	8,0	7,0	10,4	10,0
+ 20 μ Mol Orc.	6,5	6,2	6,8	6,2
5 μ Mol 5-MPG + 10 ppm Fe^{++}	3,6	7,8	11,2	12,4
+ 20 μ Mol PCS	8,6	6,6	12,6	13,5
+ 20 μ Mol KS	10,4	8,1	15,8	16,2
+ 20 μ Mol Orc.	9,7	8,6	13,9	14,0

*) 5-MPG = 5-Methylpyrogallol; PCS = Protocatechusäure; KS = Kaffeesäure; Orc. = Orcin; 2,3,4-THBS = 2,3,4-Trihydroxybenzoesäure; 2,3,5-THT = 2,3,5-Trihydroxytoluol; Fe^{++} = FeSO_4

Die in der Tabelle aufgeführten Werte zeigen im allgemeinen, daß die Gegenwart von Montmorillonit keine wesentliche Veränderung der O_2 -Aufnahme gegenüber der Kontrolle verursacht. Lediglich bei Zusatz von Eisenionen tritt bei pH 7 eine Erniedrigung und bei pH 8 eine Erhöhung der O_2 -Aufnahme ein. Dies bedeutet, daß Montmorillonit als solcher indifferent gegenüber den bei der Phenoloxydation ablaufenden Reaktionen ist. Die Zugabe von freien Eisenionen zeigte sich deutlich wirksam und machte sich in den Kontrollproben und den Proben mit Montmorillonitzugabe in einer Erhöhung der O_2 -Aufnahme bemerkbar. Aus der Elementarzusammensetzung des Montmorillonits ist bekannt und aus Tab. 1 geht hervor, daß Eisenionen und andere Schwermetallionen Bauelemente des Strukturgitters sind. Durch den festen Einbau sind jedoch diese Schwermetallionen als zusätzliche Katalysatoren der Phenoloxydation unwirksam. Zusätzlich zugegebenes Eisen könnte bei pH 7 sorbiert werden, bei pH 8 wahrscheinlich nicht mehr. Dies könnte die unterschiedliche Wirksamkeit des Eisens in Gegenwart von Montmorillonit bei pH 7 und pH 8 erklären. Sorptionsercheinungen der Phenole, die sich eventuell bei der Oxydation auswirken könnten, spielen nach dem in Abschnitt 3.6 geschilderten Ergebnissen keine Rolle im pH-Bereich von 7 oder 8, da die Phenole nicht mehr nennenswert sorbiert werden konnten..

4. DISKUSSION

=====

Die im experimentellen Teil geschilderten Versuche zeigen, daß die im Boden weit verbreiteten Tonminerale einen ausgeprägten Einfluß auf das Wachstum, den Stoffwechsel und die Bildung von Zwischenprodukten bei Mikroorganismen haben können. Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, betrifft dieser Einfluß nicht nur einzelne Mikroorganismengruppen, sondern scheint sich ziemlich universell über das gesamte Spektrum der Mikroorganismen zu manifestieren. Um den Einfluß näher spezifizieren zu können, wurden daher 2 Pilzarten ausgewählt, die durch ihre Fähigkeit zur Bil-

dung von Huminstoffen einmal hinsichtlich der spezifischen organischen Bodensubstanz interessant sind, zum anderen erschienen sie für Versuche über den Einfluß von Tonmineralen auf die Bildung von mikrobiellen Produkten als solchen geeignet.

Mehrere Autoren (CONN und CONN, 1941; NAUMOVA und GROMYKO, 1953; FILIP, 1967a, b, c, d, 1968a, c u.a.) stellten eine Erhöhung der Mikroorganismenzahl in Kulturen mit zugesetzten Tonmineralen fest, die in einem rascheren Substratumsatz ihren Grund haben könnte. Jedoch deuten einige der Ergebnisse von FILIP (1969b) nicht nur auf eine raschere, sondern auch auf eine bessere Ausnutzung der Nährstoffe für biosynthetische Prozesse hin. Der Autor hatte diese Untersuchungen mit einer Mischflora von Mikroorganismen durchgeführt, die in einer schwer zu übersehenden Abfolge von Reaktionen, das gebotene Substrat umwandeln. Auch deshalb erschien es nützlich, mit Einzelorganismen zu arbeiten, bei denen die Umwandlungsschritte besser zu überschauen sind.

Bei E. nigrum ist einwandfrei ein fördernder Effekt auf die Bildung der Biomasse durch Montmorillonitzusatz zu beobachten. Dieser fördernde Effekt macht sich besonders in den ersten 10 - 20 Tagen der Kultivierung bemerkbar. Unter dem Einfluß der höchsten Montmorillonitkonzentration nimmt das Mycelgewicht zunächst sehr stark zu. Die Mycelmasse erhöht sich in den Schüttelkulturen am 10. Tage bei der höchsten Montmorillonitvariante um mehr als 100 % gegenüber der Kontrolle. Bei Standkulturen ist eine mehr als 200 %ige Erhöhung zu verzeichnen. Während die Biomasse am 10. Tage mit steigender Montmorillonitkonzentration ansteigt, ist am 20. und besonders am 30. Tage die Biomasse in Versuchsvarianten mit den höheren Montmorillonitkonzentrationen rückläufig. Die Biomasse in den Kontrollvarianten der Schüttel- und Standkulturen steigt vom 10. Tage bis zum 30. Tage gleichmäßig an, jedoch erreicht das Mycelgewicht nie das der Varianten mit Montmorillonit.

Der Rückgang der Biomasse in den mit 0,5 und 1 % Montmorillonit versetzten Pilzkulturen spricht für eine früher einsetzende Autolyse. Dies wird durch die Untersuchung des Glukoseverbrauchs bestätigt (Tab. 6). Hier zeigt sich, daß bereits am 20. Tage in den Schüttel- wie auch in den Standkulturen die Glukose bei 0,5 und 1 % Montmorillonitzusatz verbraucht ist. Ähnlich beschleunigt ist auch der Stickstoffverbrauch. Am 10. Tage der Kultivierung ist bei den Schüttelkulturen der Stickstoffverbrauch in den Varianten mit dem höchsten Montmorillonitzusatz gegenüber der Kontrolle etwa zweimal so hoch, bei den Standkulturen sogar dreimal so hoch. Die früher einsetzende Autolyse macht sich in der früheren Ammoniakausscheidung bemerkbar, die desto früher einsetzt je mehr Montmorillonit den Varianten zugesetzt war. Im Gegensatz zur Glukose ist der Stickstoff nie vollständig verbraucht worden. Er stellt demnach unter den gewählten Bedingungen keinen begrenzenden Faktor für das Wachstum dar.

Die Konzentration der H-Ionen in den Kontrollen steigt während des Pilzwachstums von einem anfänglichen pH-Wert 6,0 auf etwa 4,5 bis 5 an und sinkt während der Autolyse auf pH 7 bis 8 ab. Die mit dem Montmorillonit versetzten Proben zeigen entsprechend der Ton-Konzentration einen rascheren pH-Abfall und einen rascheren Anstieg. Es wird jedoch durch den Montmorillonitzusatz nicht der Ablauf der Einstellung des pH-Wertes als solcher geändert, sondern die Änderungen der pH-Werte erfolgen nur in einem kürzeren Zeitabschnitt. Solche Änderungen der pH-Werte wurden bei vielen Mikroorganismen unter nichtkontinuierlichen Kultivierungsbedingungen beobachtet. Der pH-Abfall muß nicht nur durch eine Anhäufung von Säuren verursacht sein. Wahrscheinlich spielt dabei auch eine selektive Ionenaufnahme eine Rolle (GLADTKE und BRUCKER, 1958). Der pH-Anstieg wird durch die Ausscheidung von Ammoniak verursacht. Es ist nicht ausgeschlossen, daß auch die beim Montmorillonit bekannte Fähigkeit zum Kationenaustausch

den Verlauf der pH-Kurve beeinflussen könnte. Daraus schliessen z.B. STOTZKY (1966), sowie MACURA (1967) auf eine für die Mikroorganismen günstige Änderung des pH-Wertes im Kulturmedium. Diese sollte sich als zusätzliche Pufferwirkung des Montmorillonits bemerkbar machen. Die hier geschilderten Ergebnisse sprechen jedoch nicht dafür, daß der pH-Wert im beimpften Kulturmedium über längere Zeit konstant gehalten wird.

In unbeimpften Kulturmedien mit verschiedenen Montmorillonitzusätzen tritt auch nach längerer Zeit keine Änderung des anfänglichen pH-Wertes von 6,0 ein. Dies beweist, daß der raschere pH-Abfall in den beimpften Kulturen durch das beschleunigte Wachstum der Pilze verursacht wird. Ferner kann daraus geschlossen werden, daß die selektive Kationenaufnahme unter den hier verwendeten Bedingungen durch die Montmorillonitzugabe nicht beeinflußt wird. Wenn, wie im Falle von Stachybotrys chartarum das Wachstum durch manche Montmorillonitkonzentration schwach gehemmt war, zeigte auch die pH-Kurve gegenüber der Kontrolle einen verzögerten Verlauf.

Der beschleunigte Verbrauch der Nährstoffe könnte zu der Annahme führen, daß die Erhöhung der Biomasse diesem Verbrauch äquivalent ist. Ein Maß für die Ausnutzbarkeit einer Energiequelle zur Bildung der Biomasse ist das Verhältnis aus Biomasse und verbrauchter Energiequelle, das als "ökonomischer Koeffizient" bezeichnet wird. Die Berechnung dieses Koeffizienten für die Schüttel- und Standkulturen von E. nigrum (Tab. 8 u. 9) zeigt eine Erhöhung mit steigendem Montmorillonitgehalt, besonders am 10. Tag. Dies spricht also dafür, daß die Erhöhung der Biomasse nicht nur auf den rascheren Verbrauch der Nährstoffquelle zurückzuführen ist, sondern auch auf eine bessere Ausnutzung. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Versuchen, die von HAIDER et al. (1970) bei verschiedenen Hefen und Schimmelpilzen durchgeführt wurden und die eine Erhöhung der Biomasseproduktion

und des ökonomischen Koeffizienten bei Montmorillonitzusatz ergaben.

Als Vergleichsminerale zum Montmorillonit wurden Kaolinit und Quarzsand angewendet. Diese unterschieden sich durch den Bau des Kristallgitters, das keine Aufweitbarkeit erlaubt und durch eine wesentliche niedrigere Austauschkapazität. Beide Minerale hatten einen wesentlich geringeren, aber gut erfaßbaren Einfluß auf das Wachstum von E. nigrum. Ähnlich beschreiben auch STOTZKY (1966) und NOVÁKOVÁ (1966) einen weniger ausgeprägt fördernden oder manchmal sogar hemmenden Effekt von Kaolinit auf die Atmung von verschiedenen Bakterien und Pilzen.

Diese Versuche zeigen, daß die Beeinflussung der Mikroorganismen nicht ausschließlich auf die aufweitbaren Tonminerale mit hoher Austauschkapazität beschränkt ist, obwohl Montmorillonit als Vertreter dieser Gruppe die stärkste Wirkung hat.

In den Schüttelkulturen war durch die ständige Bewegung des Kulturmediums ein guter Kontakt zwischen Mikroorganismen und Tonmineraloberfläche gewährleistet. In den Standkulturen war dieser Kontakt schlechter, jedoch war auch hier ein Effekt zu beobachten, der nahe an den der Schüttelkulturen kam. Hängt die Tonmineralwirkung nur von dem unmittelbaren Kontakt der Tonmineraloberfläche mit den Mikroorganismen ab, so dürfte sich keine Wirkung zeigen, wenn dieser direkte Kontakt ausgeschlossen wird. Um hierfür eine Entscheidung treffen zu können, wurden Montmorillonit, Kaolinit und Quarzsand in Dialysierschläuche eingeschlossen und dann den Schüttelkulturen zugegeben. Die Ergebnisse dieser Versuche deuten auf einen ähnlichen Einfluß des Montmorillonits auf das Pilzwachstum hin, wie es bei den vorher durchgeführten Schüttelkulturen der Fall war. Die Ausbeuten an Biomasse waren bei den Versuchen mit Kaolinit und Quarzsand denen der Kontrolle nahezu gleich. Die Dialysierschläuche, die für diese Versuche verwendet wurden,

lassen den Transport von Ionen und niedermolekularen Stoffen bis zu einem Molekulargewicht von etwa 10 000 zu. Es liegt also die Annahme nahe, daß die Wirkung der Tonminerale von einem Austausch oder Sorption von Substanzen niedrigeren Molekulargewichts abhängen könnte.

Im Gegensatz zu E. nigrum zeigte die Zugabe von Montmorillonit zu Standkulturen von S. chartarum keine so ausgeprägte Förderung des Mycelwachstums. Die Zugabe von 0,25 % Montmorillonit wirkte sich als hemmend aus, während die 1 %ige Zugabe das Mycelwachstum stimulierte. Zusatz von 0,5 % Kaolinit oder Quarzsand hatten keine Änderung in Bezug auf die Biomasse gegenüber der Kontrolle zur Folge. Diese Versuche waren mit einer Nährlösung auf Glukose-Asparagin-Basis durchgeführt worden. Ähnliche Versuche mit S. chartarum, die von MARTIN und HAIDER (1970) mit einer Nährlösung auf Glukose- NaNO_3 -Basis durchgeführt wurden, zeigten bei Zugabe von 0,5 % Montmorillonit und 0,5 % Kaolinit eine deutliche Erhöhung des Mycelgewichtes. Man kann daher annehmen, daß die Zusammensetzung der Nährlösung und insbesondere die Stickstoffquelle und vielleicht ein unterschiedliches C:N-Verhältnis der Nährlösung eine Rolle für die Hemmung oder Förderung des Mycelwachstums spielen. Sorptive Erscheinungen dürften dabei nicht entscheidend sein, da im Abschnitt 3,5 gezeigt werden konnte, daß Asparagin nicht bedeutend sorbiert wird und das gleiche auch für den Nitrat-Stickstoff gilt. Der Asparaginzusatz zur Nährlösung führt zu einem allgemein intensiveren Wachstum von S. chartarum als der Zusatz von NaNO_3 . Auch zeigten Versuche von NOVÁK (1963), daß Asparagin eine günstigere Stickstoff- und Kohlenstoffquelle für Humifizierungsprozesse im Vergleich zu anderen Substraten darstellt. Einen gewissen Hemmeffekt durch Tonmineralzusätze beschreibt AMBROŽ (1965). HAIDER et al. (1970) beobachteten bei der Züchtung von verschiedenen *Penicillium*arten unter Bedingungen einer Standkultur ebenfalls einen Hemmeffekt durch Montmorillonitzusatz. Schüttelkulturen dieser Organismen zeigten bei gleicher

Tonkonzentration in der Nährlösung eine Erhöhung der Biomasse gegenüber der Kontrolle. Die in der vorliegenden und den anderen zitierten Arbeiten gefundene Erhöhung oder Erniedrigung der Biomasse spiegelt sich auch im Verbrauch der Nährstoffe wieder. Der ökonomische Koeffizient zeigte bei einer Förderung der von S. chartarum gebildeten Biomasse eine Erhöhung und lag etwa in der Höhe der Kontrollwerte bei einer verminderten Biomasse.

Nach Angaben von FORSTER und WAKSMAN (1939) wird der ökonomische Koeffizient bei Rhizopus stolonifer durch die Zugabe von Zink beträchtlich erhöht. Da Zink, wie auch andere Spurenelemente, im Montmorillonit vorhanden sind, liegt der Gedanke nahe, daß die Zugabe von Montmorillonit sich bei der Versorgung mit Spurenelementen bemerkbar macht. Versuche von VÄGNER (1970) mit Serratia marcescens konnten jedoch einen Effekt des Bentonits als Quelle von Spurenelementen ausschließen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nährlösungen waren ausreichend mit Spurenelementen versetzt, dieses bestätigt auch die unterschiedliche Wirkung des Montmorillonitzusatzes zu S. chartarum-Kulturen. Die gegenüber der Kontrollvariante gleichbleibenden oder erhöhten ökonomischen Koeffizienten zeigen, daß die dem Kulturmedium durch die höheren Montmorillonitkonzentrationen potentiell zugesetzten Spurenelemente auch keine schädigende oder fördernde Wirkung auf das Mycelwachstum hatten.

Mit zunehmendem Alter der Kulturen von E. nigrum und S. chartarum setzt eine Verfärbung des Nährmediums und des Mycels ein. In Anwesenheit des Montmorillonits erfolgte die Verfärbung der E. nigrum-Kulturlösung früher und war mit steigenden Konzentrationen vertieft. Messungen der Extinktion bei 475 nm von Schüttel- und Standkulturen bestätigen dies. Dabei lag die Extinktion der Standkulturen wesentlich höher als die der Schüttelkulturen. Dementsprechend liessen sich nur aus den Standkulturen beträchtliche Mengen von Huminsäuren aus der Lösung gewinnen, während aus den Schüttelkulturen keine Huminsäuren ausfällbar waren.

Bei den Standkulturen wurden aus der Lösung mit steigender Montmorillonit-Konzentration steigende Mengen von Huminsäuren erhalten, die bei der höchsten Montmorillonitkonzentration die Kontrolle um etwa das 3-fache übersteigen. Ähnlich kommt ein Anstieg der aus dem Mycel durch Natronlauge extrahierbaren Huminsäuren (HS_2) in den Varianten mit dem Montmorillonit-Zusatz gegenüber der Kontrolle deutlich zum Ausdruck. Jedoch sinkt die Menge der HS_2 -Fraktion mit steigendem Montmorillonitgehalt. Die gleiche Tendenz zeigten auch die Fraktionen der Huminsäuren, die sich erst nach saurer Hydrolyse des Mycels extrahieren liessen (HS_3). In den Schüttelkulturen findet man lediglich eine relativ hohe Menge von Huminsäuren im Mycel, die mit steigender Montmorillonitkonzentration ansteigt. Die Gesamtbilanz der Huminstoffe ist in allen Fällen von den nichtfällbaren Stoffen, den sogenannten Fulvosäuren beeinträchtigt. Der Anteil an Huminsäuren liegt aber bei den Montmorillonit-Varianten gegenüber den Fulvosäuren immer höher.

Von HAIDER und MARTIN (1967) wurde aufgrund des Vorkommens von Phenolen im Nährmedium vermutet, daß die Bildung der Huminsäuren bei E. nigrum hauptsächlich in der Lösung abläuft. Daneben fanden die Autoren aber auch beträchtliche Mengen von Huminsäuren im Mycel. Die hier wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, daß es zuerst im Mycel zur Bildung der Huminsäuren oder Fulvosäure-ähnlichen Vorstufen kommt, die mit zunehmender Autolyse des Mycels in die Lösung freigesetzt werden. Je höher der Anteil der Lösungshuminsäure an der Gesamtbilanz war, desto niedriger war der Anteil der Mycelhuminsäure vertreten. Dies zeigt sich auch deutlich bei S. chartarum. Bei diesem Organismus läßt sich die Hauptmenge der Huminsäuren aus dem Mycel isolieren. Die Fraktion der Huminsäure, die sich erst nach saurer Hydrolyse aus dem Mycel freisetzen läßt (HS_3), nimmt mit zunehmender Montmorillonitkonzentration ab, während die HS_2 -Fraktion zunimmt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die zunächst im Mycel gebildeten Huminsäuren immer leichter extrahierbar werden und anschließend in die Lösung austreten.

Die Nährlösung der Schüttelkulturen von E. nigrum zeigten eine wesentlich niedrigere Extinktion bei 475 nm als die Standkulturen. Aus diesen Lösungen liessen sich auch keine Huminsäuren ausfällen. Es ist daher naheliegend, daß die bessere Sauerstoffversorgung der Schüttelkulturen zu einer vollständigen Assimilierung der zugesetzten Nährstoffe für den Baustoffwechsel führt. Syntheseprodukte für eine Bildung der Huminsäurevorstufen stehen daher nicht in so großem Maß zur Verfügung.

Kaolinit und Quarzsand beeinflussen die Huminsäurebildung zwar nicht so stark wie Montmorillonit, jedoch sind auch hier die gebildeten Mengen an Huminsäuren gegenüber der Kontrolle erhöht. Ähnlich wie bei den Versuchen mit Montmorillonit treten zuerst die im Mycel gebildeten Huminsäuren auf.

Die von beiden Organismen gebildeten Huminsäuren sind ein direktes Produkt einer mikrobiellen Biosynthese. Aufgrund der chemischen Konstitution der Huminsäurevorstufen ist zu schliessen, daß Acetat und Malonat-Einheiten neben Shikimisäure die Bausteine darstellen. Diese Bausteine werden zu den Phenolen umgewandelt, die dann zu den Huminsäuren polymerisieren. Die Phenole stellen dabei anabolische Produkte dar, die sich durch enzymatische Umwandlung der katabolisch gebildeten Acetat- und Malonat-Einheiten formieren. Betrachtet man die Bildung der Pilzhuminstoffe unter einem solchen Aspekt, so ist die Ausnutzung der Energiequelle für die Bildung des Endproduktes interessant, vor allem wenn man sie im Zusammenhang mit der Wirkung der Tonminerale sieht. Aus diesem Grunde wurde die Relation zwischen der gesamten Huminsäuremenge und der verbrauchten Glukose gebildet. Diese Relation, nach der NOVÁK (1963) die "Produktivität der Humifizierung" beurteilt, steigt bei E. nigrum mit steigender Montmorillonitzugabe, besonders am 20. Tage der Kultivierung, sowohl in den Schüttel- als auch in den Standkulturen. Auch das Verhältnis der gesamten Huminsäuremenge zur gebildeten Biomasse liegt bei den Kul-

turen mit Montmorillonit beträchtlich höher als bei der Kontrolle.

Die chemischen Eigenschaften der Pilzhuminstoffe (C- und N-Gehalt, Gehalt an funktionellen Gruppen) entsprach im allgemeinen den von MARTIN et al. (1967) und HAIDER und MARTIN (1969) angegebenen Werten. Auch die von SPRINGER und WAGNER (1952), MÜCKE et al. (1959) sowie KONONOVA (1966) für Pilzhuminsäuren angegebenen Werte stehen hiermit in guter Übereinstimmung. Die etwas niedrigeren C-Werte beruhen auf der hier angewandten Methode zur Bestimmung des Kohlenstoffs. Die Proben der Huminsäuren, die aus den Kulturen mit Montmorillonit gewonnen worden waren, lagen besonders bei den E. nigrum-Präparaten niedriger im C- und manchmal höher im N-Gehalt. Die Summe der funktionellen Gruppen war erniedrigt. Auch die spektrophotometrischen Messungen zeigen, daß diese Huminsäuren eine niedrigere optische Dichte haben. Die S. chartarum-Huminsäuren waren jedoch in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften in allen Varianten sehr ähnlich. Dies berechtigt zu der Annahme, daß die chemischen Prozesse bei der Bildung der Huminsäuren durch Tonminerale nicht wesentlich beeinflußt sind.

Um zu sehen, ob die Tonminerale auf die Bildung der Huminstoffe in der Lösung einen Einfluß nehmen können, wurden Versuche über die Sorption von phenolischen Huminsäure-Vorstufen an Montmorillonit durchgeführt. Den gleichen Zweck verfolgten Versuche über die Beeinflussung der Oxydierbarkeit von Pilzphenolen bei Anwesenheit von Montmorillonit. Die Ergebnisse der Sorptionsversuche zeigten hauptsächlich in saurem pH-Bereich eine teilweise Sorption der Phenole, besonders der Phenolcarbonsäuren. Im neutralen und alkalischen Bereich wird jedoch die Sorption schwächer oder hört ganz auf. Die Röntgenbeugungsspektren des den Pilzkulturen zugesetzten Montmorillonits zeigten, daß auch eine Einlagerung in die Zwischenschichträume möglich ist.

Hier weiten sich die Schichtpakete in den ersten 10 Tagen, in der auch der pH-Wert der Kulturlösung im sauren Bereich liegt, auf und kontrahieren sich im weiteren Verlauf der Kultivation. Dies hat wahrscheinlich seinen Grund in einem Austausch der adsorbierten organischen Stoffe durch die im Verlauf der Mycel-Autolyse gebildeten NH_4^+ -Ionen.

Die Autooxydation der Phenole erfolgt im neutralen und schwach alkalischen Bereich. Da hier die Sorption vernachlässigt werden kann, ist dies wahrscheinlich der Grund, weshalb die Zugabe von Montmorillonit die Autooxydation von Phenolgemischen nicht beeinflusst. Eine höhere Oxydationsrate dieser Phenolgemische könnte nur noch erwartet werden, wenn die im Montmorillonit vorhandenen Schwermetalle als zusätzliche Oxydationskatalysatoren wirken; dies ist jedoch nicht der Fall. Lediglich durch die Zugabe von Eisenionen bei pH 8 konnte eine Erhöhung der Oxydationsrate erreicht werden. Bei Anwesenheit von Montmorillonit war diese bei pH 7, nach Eisenzugabe gegenüber der Kontrolle sogar erniedrigt. Der Grund hierfür könnte in der Beobachtung sein, daß bei pH 6 stabile Komplexe von 2-wertigen Schwermetallionen mit Tonmineralen gebildet werden (KABATA-PENDIAS, 1968).

Frühere Befunde von FILIP (1967d, 1968c, 1969a) zeigten eine Erhöhung der Huminstoffbildung in Sandkulturen und teilweise im Boden durch eine Mischflora der Bodenmikroorganismen nach Bentonitzugabe. Dabei wurde nicht festgestellt, ob die Erhöhung der Huminstoffbildung ihre Ursache in einer Stimulation der Mikroorganismenflora hat, oder ob der zugesetzte Bentonit durch chemische oder physikalische Beeinflussung der Prozesse zu höheren humifizierungsraten führt. Die hier geschilderten Ergebnisse schliessen nicht aus, daß beide Möglichkeiten in Betracht gezogen werden können. Es erwies sich jedoch, daß durch den Tonmineralzusatz vor allem das Wachstum der Pilze gefördert wird. Dieser Einfluß macht sich sekundär in einer verstärkten Bildung der Huminstoffe bemerkbar. Ergänzend hierzu zeigte sich, daß der Stoffwechsel der Pilze in Richtung einer erhöhten Umwandlung der

zugesetzten Kohlenstoffquelle zu Huminstoffen beeinflusst wird.

Nach KAŠ et al. (1969) stellt die Art und die Konzentration des Tons einen wichtigen Faktor für dessen Wirksamkeit dar. Man kann jedoch annehmen, und auch die hier wiedergegebenen Ergebnisse dafür sprechen, daß es trotz starker Variabilität, einen gemeinsamen Mechanismus der Tonwirkung geben kann. Dieses wird von STOTZKY (1966) in einer Pufferwirkung der Tonminerale gesucht, die gleichzeitig eine gewisse Menge an mineralischen Nährstoffen ins Nährmedium liefern können. Dieser Autor, wie auch NOVÁKOVÁ (1966), stellen weiterhin die Austauschkapazität der Tone und den Typ des im Austauschkomplex anwesenden Kations in den Vordergrund. Die hier geschilderten Ergebnisse bestätigen die Befunde, daß sich die unterschiedliche Konzentration an Tonmineralen verschieden stark auswirken kann. In Anwesenheit der Tonminerale wurde keine absolute Veränderung im Verlauf der pH-Werte beobachtet; es fand lediglich eine gewisse Beschleunigung im Verlauf der pH-Änderung statt. Diese braucht jedoch kein durch den Tonzusatz hervorgerufener Effekt zu sein, sondern ist wahrscheinlich eine sekundäre Folge des beschleunigten Pilzwachstums. Im Einklang mit Versuchsergebnissen von VÁGNER (1970) wurde weiter festgestellt, daß die Wachstumsstimulation nicht durch eine potentielle Spurenelementzufuhr über die Tonminerale verursacht ist. Vielmehr könnte es zu einer lokalen Anhäufung der sorptionsfähigen Nährstoffe kommen. Berücksichtigt man noch die von mehreren Autoren bewiesenen beidseitige Adsorption der Tone und Mikroben, so ist eine mit geringsten Energieverlusten verbundene Substratausnutzung zu erwarten. Weiterhin konnte auch mit einer Adsorption wachstumshemmender niedermolekularer Zwischenprodukte des Mikrobenstoffwechsels gerechnet werden, die selbst durch die semipermeablen Membranen der Dialysierschläuche nicht behindert ist. Die Unterschiede in der Austauschkapazität der einzelnen Tonminerale scheinen sich in deren Wirksamkeit nur quantitativ widerzuspiegeln.

Obwohl es nicht völlig auszuschliessen ist, daß sich unter bestimmten Modell- bzw. Bodenbedingungen die eine oder andere Seite der Wirksamkeit von Tonmineralen vorherrscht, muß man doch annehmen, daß durch diese meistens eine komplexe Wirkung auf die Lebensvorgänge der Mikroorganismen ausgeübt wird. Unter diesem Aspekt sollte auch die Rolle der Tonminerale in der biochemischen Ökologie der Bodenmikroorganismen gesehen werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

=====

1. Die Arbeit befasst sich mit dem Einfluß von Montmorillonit, Kaolinit und Quarzsand auf die Lebenstätigkeit von zwei huminstoffbildenden Pilzen - Epicoccum nigrum und Stachybotrys chartarum. Es wurde die Bildung der Biomasse, die Ausnutzung von Nährstoffen und die Bildung von Humusstoffen untersucht. Im besonderen wurden die Veränderung der Tonminerale im Verlauf des Pilzwachstums und die Sorptionerscheinungen von Huminsäurevorstufen an Montmorillonit beobachtet und der Verlauf der Sauerstoffaufnahme von phenolischen Verbindungen in Anwesenheit von Montmorillonit verfolgt.
2. In Anwesenheit von beiden verwendeten Tonmineralen und dem Quarzsand wurde bei E. nigrum eine größere Biomassemenge gefunden. Die Erhöhung war meistens proportional der Sorptionskapazität des Minerals und nahm vor allem mit steigenden Montmorillonit-Konzentrationen zu. Bei S. chartarum war nur die höchste Konzentration des Montmorillonits in gleichem Masse wirksam. Wurden die Minerale in Dialysierschläuche eingeschlossen, so war besonders die Wirksamkeit des Montmorillonits nicht wesentlich beeinträchtigt.
3. In Anwesenheit von Mineralzusätzen wurden die Nährstoffe aus den Kulturmedien rascher aufgenommen und für die Bildung der Biomasse besser ausgenutzt, wie dies die ökonomische Koeffizienten zeigen.

4. Im Falle einer Wachstumserhöhung wurden in den Versuchsvarianten mit einem Zusatz von Tonmineralen größere Mengen an Huminstoffen als in der Kontrolle gebildet. Aufgrund einer fraktionierten Isolierung der Huminstoffe aus der Kulturlösung und aus dem Mycel kann man annehmen, daß jene zuerst im Mycel gebildet und anschließend in die Lösung freigesetzt werden.
In Schüttelkulturen von E. nigrum wurden nur Mycelhuminstoffe gefunden. Das Verhältnis zwischen Huminsäuren und deren nichtausfällbaren Vorstufen (Fulvosäuren) wurde besonders in den Varianten mit Montmorillonit zugunsten der Huminsäuren verschoben.
5. Falls die Werte der ökonomischen Koeffizienten durch den Bodenmineralzusatz erhöht waren, so wurde auch eine Erhöhung der Huminsäurebildung pro Einheit verbrauchter Glukose bzw. gebildeter Biomasse beobachtet.
6. Die E. nigrum-Huminsäuren enthielten einen hohen Aschegehalt, der quantitativ und qualitativ von den zugegebenen Mineralen abhängig war. Die optische Dichte der Huminsäurepräparate stand meist in negativer Relation zur Höhe der Mineralzugabe. Die C- und N-Gehalte sowie auch das C:N-Verhältnis und die gesamte Austauschkapazität zeigten keine starke Abhängigkeit von der Art und Menge des zugegebenen Minerals.
7. In den ersten Stadien der Pilzkultivierung wurde eine Aufweitung der Schichtpakete des Montmorillonits beobachtet. Im Verlauf des weiteren Pilzwachstums kontrahierten sich die Zwischenschichträume wieder und es stellte sich der Ausgangszustand wieder ein. Diese Schichtaufweitung war vermutlich durch Einlagerung von niedermolekularen Produkten des Pilzstoffwechsels verursacht, die später durch NH_4^+ -Ionen ausgetauscht werden können.
8. Modellversuche zur Sorption von Huminsäurevorstufen an Montmorillonit ergaben, daß besonders im sauren pH-Bereich die Phenole sorbiert werden können.

9. Modellversuche zur Autoxydation von Phenolgemischen ergaben, daß keine wesentliche Beeinträchtigung der Oxydationsrate durch den zugesetzten Montmorillonit zu beobachten war. .
10. Die Wirkung der zugesetzten Tonminerale auf Wachstum, Stoffwechsel und Huminstoffbildung der hier untersuchten Pilze könnte durch eine Beeinflussung der physikalisch-chemischen Bedingungen des Kulturmediums, der Ernährungsbedingungen und durch eine sorptive Beseitigung spezifischer Hemmstoffe bedingt sein. Diese Erscheinungen beruhen auf der Sorptionskapazität des Minerals.

LITERATURVERZEICHNIS

- =====
- ALEXANDROVA, I.V.: The role of life activity product of actinomycetes in the formation of humus substances. Potschwowedenije 1962, 12, 8-14.
- ALLISON, F.E., M.S. SHERMAN und L.A. PINCK: Maintenance of soil organic matter. I. Inorganic soil colloids as a factor in retention of carbon during formation of humus. Soil Sci. 68, 463-478 (1949).
- ALTEN, F., B. WANDROWSKI und E. KNIPPENBERG: Beitrag zur Humusbestimmung. Ergebn. Agric.-Chem. IV, B, 61-69 (1935).
- AMBROŽ, Z.: Studie o enzymatickém půdním komplexu se zaměřením na proteázy. (Studien über den enzymatischen Komplex des Bodens mit besonderer Rücksicht auf die Proteasen). Habilitationsschrift, Landwirtschaft. Hochschule Brno (1964).
- AMBROŽ, Z.: O vlivu prostředí na produkci proteáz půdními mikroby. (Über den Einfluß der Umwelt auf die Produktion der Proteasen durch Bodenmikroorganismen). Rostlinná Výroba (Praha) 11, 1081-1086 (1965).
- AMBROŽ, Z.: Zur Erkennung zweier oft im Boden vorkommenden Proteasen. Acta Univ. Agric. Brno. 52Q, 161-167 (1966a).
- AMBROŽ, Z.: Über einige Aspekte der Bentonitwirkung auf die mikrobielle Zersetzung der Eiweißstoffe im Boden. Acta Univ. Agric. Brno. 542, 402-406 (1966b).
- AMBROŽ, Z.: On the effect of bentonite on the enzymatic activity of the soil microflora. Rostlinná Výroba (Praha) 15, 209-214 (1969).
- BEDRNA, Z., J. HRAŠKO und S. SOTÁKOVÁ: Poľnohospodárske pôdoznanectvo. (Landwirtschaftliche Bodenkunde). SVPL Bratislava (1968).
- BEUTELSPACHER, H. und H.W. v. d. MAREL: Atlas of electron microscopy of clay minerals and their admixtures. Elsevier Publ. Comp., Amsterdam (1968).
- BEUTELSPACHER, H., E. MÜCKENHAUSEN, W. FLAIG und E. FIEDLER: Die Tonminerale der wichtigsten Bodentypen Mitteleuropas. I. Mitteilung: Die Tonminerale in Bodentypen aus Löss. Landbauforschung Völkenrode 16, 105-142 (1966).

- BHAUMIK, H.D. und E.F. CLARK: Soil-moisture tension and microbiological activity.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 12, 234 (1947).
- BIRCH, H.F. und M.T. FRIEND: Humus decomposition in East African Soils.
Nature 178, 500-501 (1956).
- BREMNER, J.M.: Organic forms of nitrogen. In: Methods of soil analysis (C.A. BLACK, Ed.).
Amer. Soc. Agron., Madison, 1238-1255 (1965).
- BURGES, A., H.M. HURST und B. WALKDEN: The phenolic constituents of humic acids and their relation to the lignin of the plant cover.
Geochim. cosmochim. Acta 28, 1547-1554 (1964).
- CHAO JUJ-SJAN und TSCHEN-CZJUAN: Sostav mikroorganizmov v agregatach s rasnymi diametrami. (Zusammensetzung der Mikroorganismen in Bodenaggregaten von verschiedenen Größen).
Acta ped. sin. 12, 192-195 (1964).
- CHUDJAKOV, N.N.: Selskochozjajstvennaja mikrobiologija. (Landwirtschaftliche Mikrobiologie).
Moskau (1926).
- CONN, H.J. und J.F. CONN: Synthetic soil as a bacteriological culture medium.
Soil Sci. 52, 121-136 (1941).
- DOMSCH, K.H. und W. GAMS: Pilze aus Ackerböden.
Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart (1970).
- DRAGUNOVA, A.F.: Uskorennyje metody opredelenija funkcionalnych grup guminowych kislot. (Schnellmethoden zur Bestimmung der funktionellen Gruppen von Huminsäuren).
Nautsch. Trudy Mosk. Ing.-ekonom. Inst., Verlag Sowjet Wiss., Moskau (1958).
- ENSMINGER, L.E. und J.E. GIESEKING: The adsorption of proteins by montmorillonitic soil clays.
Soil Sci. 48, 467-473 (1939).
- ENSMINGER, L.E. und J.E. GIESEKING: The adsorption of proteins by montmorillonitic clays and its effect on base exchange capacity.
Soil Sci. 51, 125-132 (1941).
- ENSMINGER, L.E. und J.E. GIESEKING: Resistance of clay-adsorbed proteins to proteolytic hydrolysis.
Soil Sci. 53, 205-209 (1942).
- ESTERMANN, E.F. und A.D. McLAREN: Stimulation of bacterial proteolysis by adsorbens.
J. Soil Sci. 10, 64-78 (1959).

- ESTERMANN, E.F., G.H. PETERSON und A.D. McLAREN: Digestion of clay-protein, lignin-protein and silica-protein complexes by enzymes and bacteria.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 23, 31-36 (1959).
- FARMER, V.C. und R.I. MORRISON: Lignin in sphagnum and phragmites and in peats derived from these plants.
Geochim. cosmochim. Acta 28, 1537-1546 (1964).
- FILIP, Z.: Příspěvek ke studiu některých složek bioorgano-minerálního komplexu. (Beitrag zum Studium einiger Bestandteile des bio-organo-mineralischen Komplexes).
Kandidatsarbeit, Landwirtsch. Hochschule Prag (1967a).
- FILIP, Z.: Effect of small additions of bentonite on the development of some groups of soil microorganisms in liquid culture.
6th Ann. Meet. Czech. Microbiol. Soc., Folia microbiol. 12, 396 (1967b).
- FILIP, Z.: Die Beeinflussung einiger Gruppen von Bodenmikroorganismen durch kleine Zugaben von Bentonit in der Sandkultur.
Sborn. VSZ Praze, Agron. Fak. A, 1967c, 83-88.
- FILIP, Z.: The development of microorganisms and production of humic substances in sand cultures with different bentonite contents.
Studies about Humus, Trans. Internat. Symp. "Humus et Planta IV", Prague, 77-80. (1967d).
- FILIP, Z.: The influence of small supplements of bentonite on the development of certain groups of microorganisms in a soil culture. (Vliv nízkých přísadků bentonitu na rozvoj některých skupin mikroorganismů v půdní kultuře).
Rostlinná Výroba (Praha) 14, 209-216 (1968a).
- FILIP, Z.: Respiration activity of soil microflora in media with a different bentonite content. (Respirační aktivita půdní mikroflory v prostředí s různým obsahem bentonitu).
Rostlinná Výroba (Praha), 14, 963-968 (1968b).
- FILIP, Z.: Development of microorganisms and humus substance formation in media with different content of bentonit. (Razvitije mikroorganizmov i obrazovanije gumusovych vescestv v sredach s razlicnym soderzaniem bentonita).
Potschwowedenije (Moskau) 1968c, 9, 55-61.
- FILIP, Z.: Characteristic of humic substances in a soil incubated with additions of bentonite. (Charakteristika humusových látek v zemině inkubované s přísadky bentonitu).
Rostlinná Výroba (Praha) 15, 377-390 (1969a).

- FILIP, Z.: Die Ammonisierungsaktivität der Bodenmikroflora in einer Umwelt mit verschiedenem Bentonitgehalt. Zbl. Bakteriöl., Parasitenkunde, Infektionskrankh., Hyg., Abt. II, 123, 616-621 (1969b).
- FLAIG, W.: Contribucion al estudio de los ácidos humínicos. Monografías de Ciencia Moderna Nr. 46, Instituto de Edafología y Fysiología Vegetal/Madrid (1955).
- FLAIG, W.: Über die biochemische Bildung von Humusstoffen aus Lignin. Proc. 4th Internat. Congr. Biochem. Vienna, II, Biochemistry of Wood, 227-246 (1958).
- FLAIG, W.: Zur Umwandlung von Lignin in Humusstoffe. Freiburger Forschungshefte A 254, 39-56 (1962).
- FLAIG, W.: Humusstoffe. In: Handbuch für Pflanzenernährung und Düngung. (Herausgegeben von H. LINSE), Springer-Verlag, Wien-New York, 382-458 (1966).
- FLAIG, W.: Beitrag zur Kenntnis der Konstitution und Re-synthese der Huminsäuren. Übersichtsreferat vor der Franz. Bodenkundl. Ges. Paris (1970).
- FLAIG, W. und H. BEUTELSPACHER: Infrarotspektren von anorganischen Bodenbestandteilen. Leitz-Mitt. f. Wiss. u. Techn. 1, 199-202 (1961).
- FLAIG, W. und K. HAIDER: Über die Beteiligung von Phenolen am Aufbau von Huminsäuren. Trans. 9th Internat. Congr. Soil Sci. III, 175-182 (1968).
- FLAIG, W., H. KURON und R. KAUL: Über die Sorption von Nucleinstoffen an Tonkolloiden. Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 71, 141-154 (1955).
- FLAIG, W., F. SCHEFFER und B. KLAMROTH: Zur Kenntnis der Huminsäuren. VIII. Mitteilung. Zur Charakterisierung der Huminsäuren des Bodens. Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 71, 33-57 (1955).
- FLAIG, W., U. SCHOBINGER und H. DEUEL: Umwandlung von Lignin in Huminsäuren bei Verrottung im Weizenstroh. Chem. Ber. 92, 1973-1982 (1959).
- FORSTER, J.W. und S.A. WAKSMAN: Specific action of zinc and other heavy metals on growth and fumaric acid formation by Rhizopus. J. Bacteriol. 37, 599-617 (1939).
- FREYTAG, H.E.: Absorptionsphotometrische Änderungen der Huminstoffe im Verlaufe des Wurzelabbaues. I. Mitteilung. Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 71, 67-76 (1955). II. Mitteilung. 72, 231-239 (1956).

- GLADKE, E. und E. BRUCKNER: Über die Ansäuerung der Kulturflüssigkeit durch Phycomyces blakesleeianus.
Arch. Mikrobiol. 29, 53-64 (1958).
- GORBUNOV, N.I.: Vysokodispersnyje mineraly i metody ich isucenija. (Hochdispersionsminerale und Methoden zu deren Studium).
Verlag Akad. d. Wiss. Moskau (1963).
- GORING, C.A.I. und W.V. BARTHOLOMEW: Adsorption of mononucleotides, nucleic acid, and nucleoproteins by clays.
Soil Sci. 74, 149-164 (1952).
- GREENLAND, D.J.: The adsorption of sugar by montmorillonite. II..Chemical Studies.
J. Soil Sci. 7, 329-334 (1956).
- GREENWOOD, D.J. und H. LEES: Decompositon of aminoacids in soils.
Plant and Soil 12, 69-80 (1960).
- GUNNISON, J.B. und M.S. MARSHALL: J. Bacteriol. 33, 401-409 (1937) [Zit. nach ESTERMANN, E.F. und A.D. McLAREN (1959)].
- HAIDER, K. und K.H. DOMSCH: Abbau und Umsetzung von lignifiziertem Pflanzenmaterial durch mikroskopische Bodenpilze.
Arch. Mikrobiol. 64, 338-348 (1969).
- HAIDER, K. und J.P. MARTIN: Synthesis and transformation of phenolic compounds by Epicoccum nigrum in relation to humic acid formation.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 31, 766-772 (1967).
- HAIDER, K. und J.P. MARTIN: Humic acid-type phenolic polymers from Aspergillus sydowii culture medium, Stachybotrys spp. cells and autoxidized phenol mixtures.
Soil Biol. Biochem. (im Druck) (1970).
- HAIDER, K., Z. FILIP und J.P. MARTIN: Einfluß von Montmorillonit auf die Bildung von Biomasse und Stoffwechselzwischenprodukte durch einige Mikroorganismen.
Arch. Mikrobiol. (im Druck) (1970).
- HATTORI, T. und H. FURUSAKA: Chemical activities of Azotobacter agilis adsorbed on resin.
J. Biochem. (Tokyo) 50, 312-315 (1961).
- HURST, H.M. und N.A. BURGESS: Lignin and humic acids.
In: Soil Biochemistry (A.D. McLAREN und G.H. PETERSON, Ed.), Dekker, Inc. N.Y., 260-286 (1967).
- HUTCHENSON, jr. T.B., R.J. LEWIS und W.A. SEAY: Chemical and clay mineralogical properties of certain Memphis catena soils of western Kentucky.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 23, 474-478 (1959).

- KABATA-PENDIAS, A.: The sorption of trace elements by soil forming minerals
Roczniki Glebozn. XIX, 56-72 (1968).
- KAŠ, V.: Zemědělská mikrobiologie. (Landwirtschaftliche Mikrobiologie).
SZN Praha (1964).
- KAŠ, V.: Mikroorganismen im Boden.
A. Ziemsen-Verlag-Wittenberg Lutherstadt (1966).
- KAŠ, V.: Současné směry v půdní mikrobiologii. (Gegenwärtige Tendenzen in der Bodenmikrobiologie).
Rostlinná Výroba (Praha) 12, 1311-1331 (1966).
- KAŠ, V., J. NOVÁKOVÁ, Z. FILIP, K. KUBISTA und R. ŠÍŠA:
K problematice působení jílových minerálů na biologickou složku půdy. (Zur Problematik der Einwirkung von Tonmineralen auf die Bodenorganismen).
Biol. Listy (Praha) 34, 12-21 (1969).
- KONONOVA, M.M.: Soil organic matter.
Pergamon Press, Oxford (1966a).
- KONONOVA, M.M.: Die Mikroorganismen und der Prozess der Humusbildung.
Dtsch. Akad. d. Landw.-Wiss. Berlin, Tagungsber. 82, 307-315 (1966b).
- KONONOVA, M.M.: Organitscheskoje vjeschtschestwo potschwy. (Organische Stoffe des Bodens).
Verlag Akad. d. Wiss. Moskau (1963).
- KONONOVA, M.M. und I.V. ALEXANDROVA: Celluloselytic myxobacteria in humifying plant residues.
Mikrobiol. 18, 132-140 (1949).
- KONONOVA, M.M. und I.V. ALEXANDROVA: Biochemistry of humic acid formation and some problems of the nutrition of plants.
Izv. AN SSSR Ser. Biol. 23, 79-88 (1958).
- KOTER, M. und J. CHODAN: Sorbcja aminokwasow w glebach. (Sorption der Aminosäuren in den Böden).
Roczniki Nauk rolniczych A 88, 763-771 (1964).
- KROLL, L. und M. KRAMER: Effect of clay minerals on the enzyme activity of soil phosphatase.
Naturwissenschaften 42, 157-158 (1955).
- KUBISTA, K.: The influence of bentonite and of aeration on the dynamics of the development of microorganisms in the case of decomposition of lucerne in a sand culture.
Rostlinná Výroba (Praha) 15, 221-228 (1969).

- KUCHARENKO, T.A.: Reakcija guminovych kislot s nejtralnymi soljami. (Die Reaktion der Huminsäuren mit Neutralsalzen) I. Mitt., II. Mitt.
Chim. tverd. topliewa 8, 9 (1937a); 8, 12 (1937b).
- KÜSTER, E.: Umwandlung von Mikroorganismen-Farbstoffen in Humusstoffe.
Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 57, 51-57 (1952).
- KÜSTER, E.: Mikrobielle Polyphenoloxidasen und Humusbildung.
Zbl. Bakteriologie. I. Orig. 160, 207-213 (1953).
- KÜSTER, E.: Humusbildung und Phenoloxidasen bei Streptomyceten.
Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenk. 69, 137-142 (1955).
- KUTZNER, H.J.: Über die Bildung von Huminstoffen durch Streptomyceten.
Landwirtsch. Forsch. 21, 48-61 (1968).
- LAATSCH, W., L. HOOPS und O. BIENECK: Über Huminsäuren des Pilzes Spicaria elegans.
Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 58, 38 (1952).
- LAHAV, N.: Adsorption of sodium bentonite particles on Bacillus subtilis.
Plant and Soil 17, 191-208 (1962).
- LAZAREW, N.M.: Tipy bioorganomineralnych sistem razlitschnych potschw. (Typen der bio-organo-mineralischen Komplexe von verschiedenen Böden).
Trudy vses. inst. s.-ch. mikrobiol. za 1941-1945 g. Selchozgis-Verlag, Maskau (1949).
- LYNCH, D.L. und L.J. COTNOIR: The influence of clay minerals on the break down of certain sunstances.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 20, 367-370 (1956).
- LYNCH, D.L., L.M. WRIGHT und L.J. COTNOIR: The adsorption of carbohydrates and related compounds on clay minerals.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 20, 6-9 (1956).
- MACURA, J.: Einfluß der Tonminerale auf den Abbau und die Nitrifizierung des Glycins im Boden.
Seminarium des Mikrobiol. Inst. d. CSAV in Prag (1967).
- MANSKAJA, S.M. und L.A. KODINA: Aromatische Ligninstrukturen und ihre Bedeutung bei der Bildung von Huminsäuren.
Potschwowedenije 1968, 8, 79-84.
- MARTIN, J.P. und K. HAIDER: Phenolic polymers of Stachybotris atra, Stachybotrys chartarum and Epicoccum nigrum in relation to humic acid formation.
Soil Sci. 107, 260-270 (1969).

- MARTIN, J.P. und K. HAIDER: Microbial activity in relation to soil humus formation.
Soil Sci. (im Druck) (1970).
- MARTIN, J.P., S.J. RICHARDS und K. HAIDER: Properties and decomposition and binding action of "humic acids" synthesized by Epicoccum nigrum.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 31, 657-662 (1967).
- McLAREN, A.D.: Enzyme action in structurally restricted systems.
Enzymologia 20 (1960).
- McLAREN, A.D. und E.F. ESTERMANN: Adsorption and reactions of enzymes and proteins on kaolinite.
Arch. Biochem. Biophys. 61, 158-173 (1956).
- McLAREN, A.D., G.H. PETERSON und I. BARSHAD: The adsorption and reactions of enzymes and proteins on clay minerals. IV. Kaolinite and montmorillonite.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 22, 239-244 (1958).
- MIYAMOTO, Y.: Further evidence for the longevity of soil-borne plant viruses adsorbed on soil particles.
Virology 9, 290-291 (1959).
- MOKRASCH, L.C.: Glukosebestimmung nach der Anthron-Methode.
J. biol. Chemistry 208, 55-59 (1954).
- MORTLAND, M.M. und J.E. GIESEKING: The influence of clay minerals on the enzymatic hydrolysis of organic phosphorus compounds.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 16, 10-13 (1952).
- MÜCKE, D., R. OBENAU und L. KIPKE: Isolierung der Huminsäuren von Cephalosporium gordonii.
Acta Biol. et med. German. 3, 2 (1959).
- MÜLLER, H.P. und L. SCHMIDT: Kontinuierliche Atmungsmessungen an Azotobacter chroococcum Beij. in Montmorillonit unter chronischer Röntgenstrahlung.
Arch. Mikrobiol. 54, 70-79 (1966).
- NAUMOVA, A.N. und E.P. GROMYKO: Vlijanije obrabotanogo gumbrina na mikrofloru serozemnoj pocvy. (Der Einfluß von Gumbrin auf die Mikroflora einer Grauerde).
Mikrobiol. 22, 1 (1953).
- NOVÁK, B.: Contribution to the theory of microbial formation of humus.
F. Social. Agr. Sci. XII, 401-418 (1963).

- NOVÁKOVÁ, J.: Vliv jílových minerálů na růst mikrobu a využívání substrátu mikroorganismy. (Der Einfluß von Tonmineralen auf das Wachstum der Mikroben und die Ausnutzung der Nährstoffe durch Mikroorganismen). Abschlussbericht, Arch. VUM Praha (1966).
- NOVÁKOVÁ, J.: The effect of different amounts of bentonite and kaolinite on the decomposition of glucose. Studies about Humus, Trans. Intern. Symp. "Humus and Planta IV", Prague, 185-188 (1967).
- NOVÁKOVÁ, J.: Einfluß der Tonminerale auf die mikrobiologische Aufnehmbarkeit der Kohlenwasserstoffe und N-haltigen Stoffe. I. Mitteilung: Ausnutzung der Glukose durch die komplexe Bodenmikroflora in Sandkulturen. Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankh., Hyg. Abt. II, 122, 233-241 (1968).
- NOVÁKOVÁ, J.: The influence of different quantities of bentonite and kaolinite on glukose mineralisation. Rostlinná Výroba (Praha) 15, 215-220 (1969).
- NOVOGRUDSKY, D.M.: Untersuchungen über das Bakterienadsorptionsvermögen der Böden. I. Verteilung der Mikroorganismen zwischen der festen und flüssigen Phase des Bodens. II. Adsorptionsfähigkeit des Bodens für verschiedene Mikroorganismen in Abhängigkeit vom pH. Mikrobiol. 5, 364-384, 623-644 (1936).
- PEELE, T.C.: Cornell Univ. Agr. Exp. Stat. Mem. 197, 1-18, (1936) [Zit. nach ESTERMANN, E.F. und A.D. McLAREN (1959)].
- PINCK, L.A. und F.E. ALLISON: Resistance of protein-montmorillonite complexes to decomposition by soil microorganisms. Science (London) 114, 130-131 (1951).
- PINCK, L.A., R.R. DYAL und F.E. ALLISON: Proteinmontmorillonite-complexes, their preparation and the effect of soil microorganisms on their decomposition. Soil Sci. 78, 109-118 (1954).
- PINCK, L.A., W.F. HOLTON und F.E. ALLISON: Antibiotics in soils. I. Physico chemical studies of antibiotics. clay complexes. Soil Sci. 91, 22-28 (1961).
- PINCK, L.A., D.A. SOULIDES und F.E. ALLISON: Antibiotics in soils. II. Extent and mechanisms of release. Soil Sci. 91, 94-99 (1961).

- PLOTHO, O.v.: Weitere Untersuchungen zur Humusbildung der Mikroorganismen.
Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 55, 151-169 (1951).
- PUTNAM, H.D. und E.L. SCHMIDT: Studies on the free amino acids fraction of soils.
Soil Sci. 87, 22-27 (1959).
- SCHEFFER, F. und B. ULRICH: Lehrbuch der Agrikulturchemie und Bodenkunde. III. Teil: Humus und Humusdüngung.
F. Enke Verlag-Stuttgart (1960).
- SKUJINS, J.J.: Enzymes in soil. In: Soil Biochemistry (A.D. McLAREN und G.H. PETERSON Ed.) M. Dekker, Inc. N.Y., 371-414 (1967).
- SPRINGER, U. und A. WAGNER: Zur Kenntnis der von Pilzen gebildeten huminsäureähnlichen Substanzen unter besonderer Berücksichtigung von Stachybotris lobulata.
Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 3, 145-172 (1952).
- STOCH, L. und W. SIKORA: A study of grain size distribution of clay minerals in soils and clays.
Roczniki Glebozn. XIX, 291-298 (1968).
- STEJSKAL, J.: Zemědělská geologie. (Landwirtschaftliche Geologie).
SZN Praha (1967).
- STOTZKY, G.: Influence of clay minerals on microorganisms. II. Effect of various clay species, homoionic clays, and other particles on bacteria.
Canad. J. Microbiol. 12, 831-848 (1966a).
- STOTZKY, G.: Influence of clay minerals on microorganisms. III. Effect of particle size, cation exchange capacity, and surface area on bacteria.
Canad. J. Microbiol. 12, 1235-1246 (1966b).
- STOTZKY, G. und L.T. REM: Influence of clay minerals on microorganisms. I. Montmorillonite and kaolinite on bacteria.
Canad. J. Microbiol. 12, 547-563 (1966).
- STOTZKY, G. und L.T. REM: Influence of clay minerals on microorganisms. IV. Montmorillonite and kaolinite on fungi.
Canad. J. Microbiol. 13, 1535-1550 (1967).
- STOTZKY, G., J.E. DAWSON, R.T. MARTIN und C.H.H. TER KUILE: Soil mineralogy as a factor in the spread of Fusarium wilt of banana.
Science 133, 1483-1485 (1961).

- STREMME, H.E.: Die charakteristischen Tonminerale einiger Hauptbodentypen.
Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 65, 1-9 (1954).
- TSCHAPEK, W. und A.J. GARBOSKY: The principles of adsorption of the Azotobacter.
Trans. 4th Intern. Congr. Soil Sci. Amsterdam 3, 102-104 (1950).
- TSCHUCHROV, F.V.: Kolloidy v semnoj kore. (Kolloide in der Erdkruste).
Akad. d. Wiss.-Verlag, Moskau (1955).
- TURNER, E.R.: The reaction between bentonite and certain naturally-occurring compounds.
J. Soil Sci. 6, 319-326 (1955).
- VÄGNER, M.: About the stimulations effect of bentonite.
8th Ann. Meet. Czech. Microbiol. Soc., Folia Microbiol. (Prague) (in press) (1970).
- VÁLEK, B. und Mitarb.: Nomenklatura humusu. (Nomenklatur des Humus).
ÚVTI Praha (1962).
- VALLA, M.: Biologický test a spektrofotometrická charakteristika některých humusových látek. (Biologischer Test und spektrophotometrische Charakteristik einiger Humusstoffe).
Dissertation, Landwirtschaft. Hochschule Prag (1967).
- VELIKANOV, L.L. und D.G. ZVJAGINCEV: Development of microorganisms on media with adsorbents at different pH-values.
Potschwowedenije 1968, 1, 65-79.
- WAKSMAN, S.: Humus. Bailliera, Tindall and Cox, London (1936).
- ZIEMIECKA, J., J. KOBUS und J. PACEWIECZOWA: Einfluß der Zugabe von Sorbenten auf die biologische Tätigkeit der Leichtböden.
XV. Jahrestag Pol. Microbiol. Ges., Wroclaw (1963).
- ZVJAGINCEV, D.G.: Some regularities of adsorption of microorganisms on ion exchange resins.
Mikrobiologija 31, 339 (1962).
- ZVJAGINCEV, D.G. und L.L. VELIKANOV: Effect of adsorbens on the activity of bacteria growing on media containing amino acids.
Mikrobiologija 37, 1017-1023 (1968).

LEBENS LAUF

Am 23. Juni 1938 wurde ich, Zdeněk Filip, in der Familie des Dentisten Rudolf Filip und seiner Ehefrau Anežka, geb. Fulínová, in Prag/ČSSR, geboren. Meine Kindheit habe ich in Sodlec bei Tábor verbracht, wo ich auch 1944 die Volksschule besuchte. Nach Umsiedlung meiner Eltern setzte ich den Schulbesuch in Pardubice bis zur Maturitätsprüfung an der dortigen Oberschule im Juni 1955 fort.

Mein Studium habe ich 1955 an der Landwirtschaftlichen Hochschule Brno begonnen. Dieses beendigte ich 1960 mit der Staatsprüfung und erwarb den Titel Dipl.-Ing. (agr.). Das erste Jahr meiner Berufstätigkeit verbrachte ich als Lehrer an einer Landwirtschaftlichen Mittelschule in Vysoké Mýto. Für die Jahre 1961-1963 erhielt ich ein Stipendium von der Tschechoslowakischen Akademie für Landwirtschaftswissenschaften, das mir ermöglichte, im Institut für Mikrobiologie der Zentralen Forschungsanstalt für pflanzliche Produktion in Prag-Ruzyně, zu arbeiten. Im Jahr 1963 wurde ich dann an die Agronomische Fakultät der Landwirtschaftlichen Hochschule in Prag aufgenommen. Im Institut für Mikrobiologie dieser Hochschule bin ich bis jetzt als Oberassistent tätig. Im Jahr 1967 verteidigte ich eine Kandidatsarbeit und erwarb die Würde eines Candidatus scientiarum (C.Sc.). Im Jahr 1968 habe ich mich um ein Forschungsstipendium der Alexander von Humboldt-Stiftung beworben, das mir ab 1.10.1968 verliehen wurde. Dieses Stipendium ermöglichte mir im Institut für Biochemie des Bodens der Forschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig zu arbeiten und die vorgelegte Dissertationsarbeit durchzuführen und abzufassen.

Bönecke - Druck - Clausthal - Zellerfeld Postfach 29